NEUE METHODEN ZUR KINETISCHEN ANALYSE VON REAKTIONEN 2. ORDNUNG

Spektroskopisch-kinetische Untersuchung von Peptidsynthesen nach der klassischen und der liquid phase Methode

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Jürgen Polster
aus Crossen a.d.Oder

1974

74 142

Druck- und Verlagsanstalt
Werner Blasaditsch · 89 Augsburg · Theodor-Heuß-Platz 3 · Telefon (0821) 25563
Printed in Germany

NEUE METHODEN ZUR KINETISCHEN ANALYSE VON REAKTIONEN 2.ORDNUNG

Spektroskopisch-kinetische Untersuchung von Peptidsynthesen nach der klassischen und der liquid phase Methode

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Jürgen Polster
aus Crossen a.d.Oder

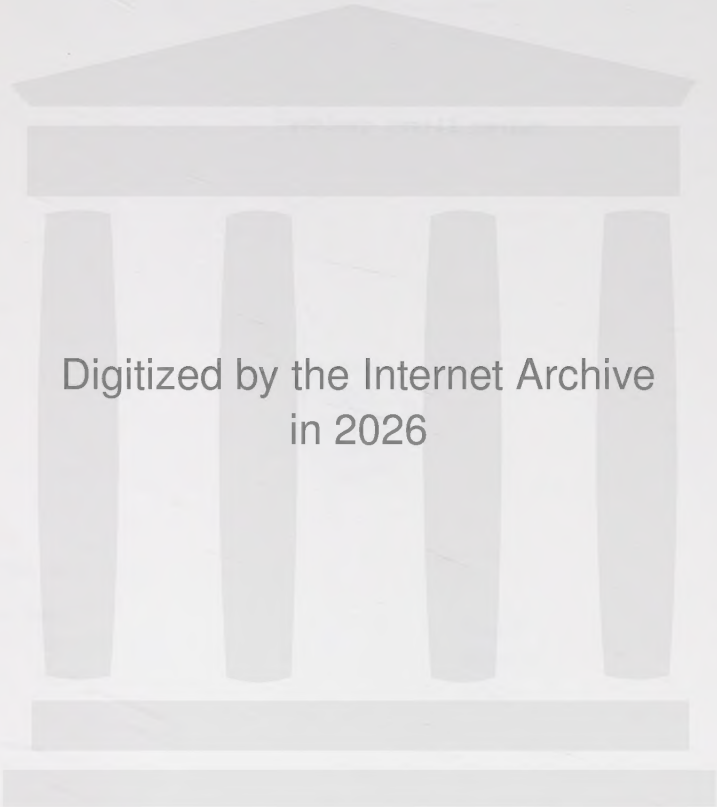
1 9 7 4

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 31.1.1974

Dekan:	Prof. Dr. E. Bayer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Mauser
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Zeil

Meinen Eltern gewidmet


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0007

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. H. MAUSER

danke ich sehr herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und für sein ständiges Interesse an ihren Problemen, besonders für seinen wertvollen Rat.

Herrn Professor Dr.E.Bayer, Herrn Dr.M.Mutter und Herrn Dr.R.Uhmann danke ich für die zur Verfügung gestellten Präparate.

Herrn Professor Dr.G.Kortüm und Herrn Professor Dr.W.Zeil danke ich für die Unterstützung der Arbeit durch Institutsmittel.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A) EINLEITUNG 1

B) THEORIE UND AUSWERTUNG

I. Extinktionsmatrizen 3

II. "Spektroskopisch einheitliche" Reaktionen 6

III. Die Reaktion von Boc-glycin-p-nitrophenolester mit n-Butylamin in Acetonitril

1. Geschlossene Integrationsform der Extinktions-Differentialgleichung im Falle gleicher Ausgangskonzentrationen 7

2.1. Das E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramm 11

2.2. Das $1/(E_{\infty 1} - E_1)$, t - Diagramm 16

3. Bestimmung der Konzentrationen über das E-Diagramm 18

4. Lösung der Konzentrations-Differentialgleichung mit Hilfe der Formalen Integration 21

5. Bestimmung von $E_{\infty 1}$ und $\bar{E}_{\infty 1}$ 24

6. Geschlossene Integrationsform der Extinktions - Differentialgleichung 29

7. Lösung der Extinktions-Differentialgleichung mit Hilfe der Formalen Integration 32

8. Extinktions-Differenzengleichungen 35

9. Konzentrations-Differenzengleichungen 40

10. Vergleich der verschiedenen Methoden der Auswertung von Reaktionen 2.Ordnung 43

IV. Die Reaktion von Boc-glycin-p-nitrophenolester mit Glycinester-Verbindungen in Acetonitril

1. "Klassische" Peptidsynthese 46

2. Die Reaktion von Triäthylamin (TAA) mit Boc-gly-ONP 54

3. Die Reaktion von Tetra-n-butylammoniumhydroxid mit Boc-gly-ONP 57

4. Die Reaktion von Boc-gly-ONP mit Glycin-2-methoxy-äthylester·HCl 66

Seite

5. Das "liquid phase" System

5.1. Die Reaktion von Boc-gly-ONP mit PAG-glycin - ester 60

5.2. Die Reaktion von Boc-gly-ONP mit PAG(20 000)-$(gly)_3$·HCl 63

6. Diskussion der Nebeneffekte 65

V. Auswertungsprogramme (in CDC-FØRTRAN)

1. Beschreibung des "FØRMALIN" - PRØGRAMMES 68

2. Zusammenfassung der benutzten Programme 69

C) ZUSAMMENFASSUNG 71

D) ANHANG

I. Kinetische Messungen 73

II. Substanzen 75

F) LITERATURVERZEICHNIS 76

A) EINLEITUNG

In unserem Arbeitskreis sind verschiedene Methoden zur Auswertung von Reaktionen pseudo 1. Ordnung und von Photoreaktionen entwickelt worden. Bevorzugtes Interesse haben dabei solche Reaktionen, die spektralphotometrisch vermessen werden können. Mit Hilfe der "Reaktionsspektren", "Extinktions"- und "Extinktionsdifferenzen-Quotienten -Diagramme" kann leicht festgestellt werden, ob der untersuchte Reaktionsmechanismus kompliziert ist oder nicht. Es hat sich gezeigt, dass zur Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten bei Photoreaktionen oder Reaktionen pseudo 1.Ordnung die Methode der "Formalen Integration" gut angewendet werden kann.

Die kinetische Analyse von Reaktionen des Mechanismus A + B ⟶ C + D erfolgt i.a. über die bekannten Konzentrationsgleichungen. Die Konzentrationen der bei der Reaktion beteiligten Stoffe werden über die Extinktionskoeffizienten üblicherweise bestimmt. Dabei treten aber zusätzliche Fehler auf. Absorbieren alle Stoffe, so ist diese Methode kaum anwendbar. In der Praxis werden dann solche Wellenlängen herausgesucht, bei denen nur ein Stoff, maximal zwei Stoffe absorbieren. Oft ist dann die Extinktionsänderung während der Reaktion nicht maximal.

Aus diesem Grunde sollen hier neue Verfahren entwickelt werden, die unabhängig von den Extinktionskoeffizienten sind. Besonders bietet sich hier die Methode der Formalen Integration an. In dieser Arbeit soll dieses Verfahren für die entsprechenden Extinktions- und Konzentrations-Differentialgleichungen bei Reaktionen 2.Ordnung eingesetzt und auf ihre Leistungsfähigkeit geprüft werden. Im Vergleich hierzu sollen die über die geschlossene Integration erhaltenen Extinktionsgleichungen weiter untersucht werden. - Indem die entsprechenden Differential-gleichungen in die Differenzengleichungen überführt werden, eröffnen sich weitere Auswertemöglichkeiten, die nicht nur von theoretischem Interesse sind.

Reaktionen vom Typ A + B ⟶ C + D treten in der organischen Chemie und Biochemie häufig auf wie bei der präparativen Peptidsynthese. Diese Reaktionen sollen mit einigen geeigneten der neu entwickelten

Methoden kinetisch analysiert werden.

In Zusammenarbeit mit Herrn Professor Bayer und seinen Mitarbeitern, Herrn Dr.Mutter und Herrn Dr.Uhmann, wurden neue Systeme der Peptidsynthese, die dort entwickelt wurden, vermessen. Im Gegensatz zur Merrifield - Methode werden im sog. "liquid phase" System lösliche Polyäthylenglykolträger als Aminkomponente benutzt. Als Esterkomponente werden in dieser Arbeit p-Nitrophenolester, die günstige spektralphotometrische Eigenschaften zeigen, verwendet. Um möglicherweise kinetisch günstige Eigenschaften des "liquid phase" Systems feststellen zu können, werden hier auch die klassischen Peptidsynthesen vermessen und Vergleiche gezogen.

B) THEORIE UND AUSWERTUNG

I. Extinktionsmatrizen[1-4]

Nach Lambert-Bouguer-Beer setzt sich die Extinktion $E_l(t)$ zur Zeit t bei der Wellenlänge l, wenn n Stoffe der Konzentration c_i mit dem Extinktionskoeffizienten ε_{li} absorbieren, nach Gl.(1) zusammen aus:

$$E_l(t) = d \sum_{i=1}^{n} \varepsilon_{li}\, c_i(t) \qquad (1)$$

d = Schichtdicke der Küvette

Aendern sich in einem System die Konzentrationen der einzelnen absorbierenden Stoffe durch Reaktion um $\Delta c_i(t)$, so tritt eine Extinktionsänderung $\Delta E_l(t)$ auf:

$$\Delta E_l(t) = d \sum_{i=1}^{n} \varepsilon_{li}\, \Delta c_i(t) \qquad (2)$$

Gl.(2) lässt sich nach H.Mauser auch mit Hilfe der Reaktionslaufzahl $x_k(t)$ und dem stöchiometrischen Koeffizienten ν_{ki} für ein System mit r Teilreaktionen ausdrücken[5,6,7] :

$$\Delta E_l(t) = d \sum_{i=1}^{n} \varepsilon_{li} \sum_{k=1}^{r} \nu_{ki}\, x_k(t) \qquad (3)$$

Mit der Definition $q_{lk} = d \sum_{i=1}^{n} \nu_{ki}\, \varepsilon_{li}$ vereinfacht sich Gl.(3) zu:

$$\Delta E_l(t) = \sum_{k=1}^{r} q_{lk}\, x_k(t) \qquad (4)$$

Die angegebenen Gleichungen lassen sich auch mit Hilfe der Matrizenschreibweise ausdrücken. Hierbei ist aber die angegebene Zeitabhängigkeit von ΔE_l , c_i , Δc_i und x_k in der Schreibweise $\Delta E_l(t)$, $c_i(t)$, $\Delta c_i(t)$ und $x_k(t)$ wenig brauchbar. Vielmehr soll die Zeit als zweiter

Index t bei den genannten Grössen eingeführt werden.

Die während einer Reaktion gemessenen Extinktionen bei den Wellenlängen 1,2 ... w lassen sich in einer Extinktionsmatrix $\underline{\underline{E}}$ zusammenfassen:

$$\underline{\underline{E}} = \begin{bmatrix} E_{11} & E_{12} \cdots E_{1t} \\ E_{21} & E_{22} \cdots E_{2t} \\ \vdots & \\ E_{w1} & E_{w2} \cdots E_{wt} \end{bmatrix} \qquad (5)$$

Entsprechend gilt für die Extinktions-Differenzen-Matrix $\underline{\underline{\Delta E}}$:

$$\underline{\underline{\Delta E}} = \begin{bmatrix} \Delta E_{11} & \Delta E_{12} \cdots \Delta E_{1t} \\ \Delta E_{21} & \Delta E_{22} \cdots \Delta E_{2t} \\ \vdots & \\ \Delta E_{w1} & \Delta E_{w2} \cdots \Delta E_{wt} \end{bmatrix} \qquad (6)$$

Mit Hilfe der Gl.(2) und den Regeln der Matrizen-Multiplikation lässt sich $\underline{\underline{\Delta E}}$ als Produkt der Extinktionskoeffizientenmatrix $\underline{\underline{\varepsilon}}$ und der Konzentrationsänderungsmatrix $\underline{\underline{\Delta c}}$ darstellen:

$$\underline{\underline{\Delta E}} = \underline{\underline{\varepsilon}} \; \underline{\underline{\Delta c}} = \begin{bmatrix} \varepsilon_{11} & \varepsilon_{12} \cdots \varepsilon_{1n} \\ \varepsilon_{21} & \varepsilon_{22} \cdots \varepsilon_{2n} \\ \vdots & \\ \varepsilon_{w1} & \varepsilon_{w2} \cdots \varepsilon_{wn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Delta c_{11} & \Delta c_{12} \cdots \Delta c_{1t} \\ \Delta c_{21} & \Delta c_{22} \cdots \Delta c_{2t} \\ \vdots & \\ \Delta c_{n1} & \Delta c_{n2} \cdots \Delta c_{nt} \end{bmatrix} \qquad (7)$$

Bei Δc_{nt} gibt n den Stoff an und t den Zeitpunkt, der zu dem entsprechenden Extinktions-Differenzenwert der $\underline{\underline{\Delta E}}$ - Matrix gehört. Mittels Gl.(4) lässt sich $\underline{\underline{\Delta E}}$ auch wie folgt darstellen :

$$\underline{\underline{\Delta E}} = \underline{\underline{q}} \; \underline{\underline{x}} = \begin{bmatrix} q_{11} & q_{12} \cdots q_{1k} \\ q_{21} & q_{22} \cdots q_{2k} \\ \vdots & \\ q_{w1} & q_{w2} \cdots q_{wk} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} \cdots x_{1t} \\ x_{21} & x_{22} \cdots x_{2t} \\ \vdots & \\ x_{k1} & x_{k2} \cdots x_{kt} \end{bmatrix} \qquad (8)$$

Der erste Index bei den Symbolen E, ΔE, ε , q gibt also immer die Wellenlänge an, bei c den Stoff und bei x die Teilreaktion. Der zweite Index bei den Grössen E, ΔE, Δc und x charakterisiert den Zeitpunkt, bei ε den Stoff und bei q die Teilreaktion.

Mit Hilfe der Definition von q_{1k} lässt sich die Beziehung aufstellen:

$$\underline{\underline{q}} = \underline{\underline{\varepsilon}} \; \underline{\underline{\nu}}^{T} \qquad (d=1) \qquad (9)$$

wobei $\underline{\underline{\nu}}^{T}$ die transponierte Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten-Matrix $\underline{\underline{\nu}}$ ist:

$$\underline{\underline{\nu}} = \begin{bmatrix} \nu_{11} & \nu_{12} \cdots & \nu_{1n} \\ \nu_{21} & \nu_{22} \cdots & \nu_{2n} \\ \vdots & & \\ \nu_{k1} & \nu_{k2} \cdots & \nu_{kn} \end{bmatrix}$$

$\underline{\underline{\Delta E}}$ kann also in die folgenden Produkt-Matrizen entwickelt werden:

$$\underline{\underline{\Delta E}} = \underline{\underline{\varepsilon}} \; \underline{\underline{\Delta c}} = \underline{\underline{q}} \; \underline{\underline{x}} = \underline{\underline{\varepsilon}} \; \underline{\underline{\nu}}^{T} \; \underline{\underline{x}} \qquad (10)$$

Multipliziert man Gl.(10) von links mit der inversen Extinktions - koeffizienten-Matrix $\underline{\underline{\varepsilon}}^{-1}$, so folgt:

$$\underline{\underline{\varepsilon}}^{-1} \; \underline{\underline{\varepsilon}} \; \underline{\underline{\Delta c}} = \underline{\underline{\Delta c}} = \underline{\underline{\varepsilon}}^{-1} \; \underline{\underline{\Delta E}} \qquad (11)$$

Wird die $\underline{\underline{\Delta E}}$ - Matrix mit der inversen Matrix $\underline{\underline{\varepsilon}}^{-1}$ von links multipliziert, so kann die $\underline{\underline{\Delta c}}$ - Matrix und damit die zu den einzelnen Zeitpunkten existierenden Konzentrationen aller im System auftretenden Stoffe ermittelt werden.

II. "Spektroskopisch einheitliche" Reaktionen [6,7]

H.Mauser nennt dann Reaktionen "spektroskopisch einheitlich", wenn durch graphisches Auftragen zweier beliebiger Zeilen der $\underline{\underline{E}}$ - oder $\underline{\underline{\Delta E}}$ - Matrix die sog. "Extinktions-Diagramme" (E-Diagramme) oder "Extinktions-Differenzen-Diagramme" (ED-Diagramme) linear sind, d.h.:

$$\Delta E_{1t} = a \cdot \Delta E_{2t} \tag{12}$$

a = Konstante

Die Zeilen der $\underline{\underline{\Delta E}}$ - Matrix sind also proportional und der Rang r solcher Matrizen ist eins :

$$r\left(\underline{\underline{\Delta E}}\right) = 1 \tag{13}$$

H.Mauser bezeichnet Systeme dann als "einheitlich", wenn die Konzentrationsänderung (oder Konzentration) eines Stoffes eine lineare Funktion der Konzentrationsänderung (oder Konzentration) eines geeignet ausgewählten Stoffes ist:

$$\Delta c_{1t} = \rho_1 + \sigma_1 \Delta c_{2t} \tag{13b}$$

ρ_1, σ_1 = Konstanten

Diese Definition hat i.Vgl. zu Gl.(13) den Vorteil, dass das System unabhängig von der Messmethode beurteilt wird. "Spektroskopisch einheitliche" Systeme beziehen sich nur auf Reaktionen, die sich spektroskopisch bemerkbar machen.

Ganz allgemein gilt, wenn $\underline{\underline{\varepsilon}}$ eine spaltenreguläre Matrix ist (die Extinktionskoeffizienten der absorbierenden Stoffe sind also von den Wellenlängen linear unabhängig), der Rang der $\underline{\underline{\Delta E}}$ - Matrix gleich dem Rang von $\underline{\underline{\Delta c}}$ ist :

$$r\left(\underline{\underline{\Delta E}}\right) = r\left(\underline{\underline{\Delta c}}\right) \tag{14}$$

III. Die Reaktion von Boc-glycin-p-nitrophenolester mit n-Butylamin in Acetonitril

1. Geschlossene Integrationsform der Extinktions-Differential-gleichung im Falle gleicher Ausgangskonzentrationen

In dieser Arbeit werden nur Reaktionen 2.Ordnung vom Typ

$$A + B \longrightarrow C + D \qquad (15)$$

behandelt. Der Index, der die Zeitabhängigkeit bei den Grössen E, ΔE, Δc und x symbolisiert, wird für die weiteren Ableitungen nicht mehr mitgeführt.

Für die Reaktion der Gl.(15) lautet das Konzentrations-Zeitgesetz :

$$\frac{da}{dt} = -k\,a\,b = -\frac{dx}{dt} \qquad (16)$$

k = Geschwindigkeitskonstante 2.Ordnung ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$)
a, b = Konzentrationen der Stoffe A bzw. B zur Zeit t
x = Reaktionslaufzahl in Mol/l

Nach Gl.(4) und der Definition von q_{1k} gilt weiter :

$$\Delta E_1 = E_1 - E_{01} = q_1 \cdot x \qquad ^{+)} \qquad (17)$$

mit

$$q_1 = d\,(-\varepsilon_{1A} - \varepsilon_{1B} + \varepsilon_{1C} + \varepsilon_{1D}) \qquad (18)$$

E_{01} = Extinktion zur Zeit t = 0 bei der Wellenlänge l
ε_{1A} = Extinktionskoeffizient des Stoffes A bei der Wellenlänge l (entsprechend ε_{1B}, ε_{1C}, ε_{1D})
d = Schichtdicke der Küvette (wird nachfolgend 1 gesetzt)

Differenziert man Gl.(17) nach der Zeit t und berücksichtigt die Beziehungen

$$a = a_o - x \qquad (19)$$

$$b = b_o - x \qquad (20)$$

a_o, b_o = Anfangskonzentrationen der Stoffe A und B (zur Zeit t = 0)

+) Da die Reaktion der Gl.(15) die einzige hier untersuchte ist, kann auf den Index k in q_{1k} verzichtet werden.

so erhält man mit Gl.(16) :

$$-\frac{1}{q_1}\frac{dE_1}{dt} = -k(a_o-x)(b_o-x) = -k(a_o-\frac{(E_1-E_{01})}{q_1})(b_o-\frac{(E_1-E_{01})}{q_1}) \qquad (21)$$

Unter der Voraussetzung, dass A und B gleiche Anfangskonzentrationen haben, vereinfacht sich Gl.(21) zu :

$$-\frac{1}{q_1}\frac{dE_1}{dt} = -k(a_o-\frac{(E_1-E_{01})}{q_1})^2 = -\frac{K}{q_1^2}(a_o\,q_1 + E_{01} - E_1)^2 \qquad (22)$$

Mit Gl.(18) ist aber :

$$q_1\,a_o+E_{01} = (\varepsilon_{1C}+\varepsilon_{1D}-\varepsilon_{1A}-\varepsilon_{1B})a_o+(\varepsilon_{1A}+\varepsilon_{1B})a_o = (\varepsilon_{1C}+\varepsilon_{1D})a_o = E_{\infty 1} \qquad (23)$$

$E_{\infty 1}$ ist die Extinktion, wenn die Reaktion total abgelaufen ist.
Gl.(23) in Gl.(22) eingesetzt, gibt :

$$\frac{dE_1}{dt} = \frac{k}{q_1}(E_{\infty 1} - E_1)^2 \qquad (24)$$

Die Integration von Gl.(24) mit den Integrationsgrenzen E_{01}, E_1 bzw. t = 0 und t führt zu :

$$\frac{1}{E_{\infty 1} - E_1} - \frac{1}{E_{\infty 1} - E_{01}} = \frac{k}{q_1}\,t \qquad (25)$$

Trägt man zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten $1/(E_{\infty 1} - E_1)$ gegen t auf, so muss $E_{\infty 1}$ bekannt sein. $E_{\infty 1}$ kann experimentell oder durch graphische Extrapolation, wie unten gezeigt wird, bestimmt werden. Interessant ist, dass E_{01} aus dem Ordinatenabschnitt des $1/(E_{\infty 1} - E_1)$ - t - Diagrammes bestimmt werden kann. Dieses Verfahren ist dann von Vorteil, wenn die Reaktion A+B $\longrightarrow$ C+D schnell abläuft und somit die Extrapolation der Extinktion - Zeit - Kurve gegen t = 0 fehlerhaft wird.
Ist $E_{\infty 1}$ nicht bekannt, so stellt man Gl.(25) um :

$$\frac{E_1 - E_{01}}{t} = \frac{k}{q_1}(E_{\infty 1} - E_{01})(E_{\infty 1} - E_1) \qquad (26)$$

Trägt man $(E_1 - E_{01})/t$ gegen E_1 auf, so ist $E_{\infty 1}$ gleich dem Abszissenabschnitt, sofern der funktionale Zusammenhang erfüllt ist.

Wählt man als Integrationsgrenzen von Gl.(24) E'_{01} , E_1 bzw. t' und t, so gilt entsprechend Gl.(26) :

$$\frac{E_1 - E'_{01}}{t - t'} = \frac{k}{q_1} (E_{\infty 1} - E'_{01})(E_{\infty 1} - E_1) \qquad (27)$$

Da A und B gleichermassen umgesetzt werden, kann als Bezugspunkt für die Zeit t' jede beliebige Konzentration von A und B gewählt werden. Deswegen ist die Wahl des Extinktionswertes E'_{01} als Bezugspunkt für die Differenz $(E_1 - E'_{01})$ frei. Es kann also der 1., 2. ... m-te Extinktions-Messpunkt als Bezugspunkt eingesetzt werden.

Aus Gl.(27) folgt: je kleiner die Differenz von $(E_{\infty 1} - E'_{01})$ durch entsprechende Wahl von E'_{01} ist, um so grösser wird die Steigung im E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramm (s.Abb.3). - Alle Geraden schneiden sich auf der E_1-Achse im Punkt $E_{\infty 1}$, so dass dieser Wert durch Extrapolation genau bestimmt werden kann.

Analog zu Gl.(23) folgt :

$$E_{\infty 1} - E'_{01} = q_1 a \qquad ^{+)} \qquad (28)$$

Gl.(28) in Gl.(27) eingesetzt, gibt :

$$\frac{E_1 - E'_{01}}{t - t'} = k a E_{\infty 1} - k a E_1 \qquad (29)$$

Ist A bekannt, so kann die Geschwindigkeitskonstante aus der Geradensteigung im E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramm ermittelt werden. Ist $t' = 0$, so ist $a = a_o$, d.h. gleich der Einwaagekonzentration. Dann gilt anstelle von Gl.(29) :

$$\frac{E_1 - E_{01}}{t} = k a_o E_{\infty 1} - k a_o E_1 \qquad (29b)$$

$E_{01} = E'_{01}(t' = 0)$ = Extinktion zur Zeit $t' = 0$

+) a_o ist die Einwaagekonzentration von A und B zur Zeit $t = 0$, a die zur Zeit t', auf die E'_{01} bezogen wird.

Analog zu Gl.(17) gilt für a :

$$E_{\infty 1} - E_{01} = q_1 a_o \qquad (30)$$

$$E_{\infty 1} - E'_{01} = q_1 a \qquad (31)$$

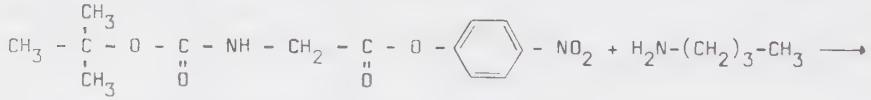
Hieraus folgt :

$$a = a_o \left(\frac{E_{\infty 1} - E'_{01}}{E_{\infty 1} - E_{01}} \right) \qquad (32)$$

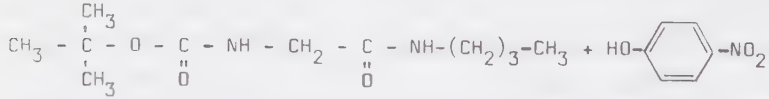
Mit dieser Gleichung kann unter Verwendung von $E_{\infty 1}$ die Konzentration zu jedem Zeitpunkt bestimmt werden.
Damit ist die Bezugskonzentration von A für E'_{01} bekannt und k kann für jeden E'_{01} - Wert als Bezugspunkt berechnet werden (s.Gl.(29)).- Gl.(17) zeigt, dass die Steigung im E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramm unabhängig von der benutzten Wellenlänge ist (s.Abb.2) .

2.1. Das E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramm

Um die im Abschnitt III.1. entwickelten Diagramme zu testen, wurde folgende Reaktion gewählt :



tert. Butoxycarbonyl-glycin-p-nitrophenolester[+)] n-Butylamin

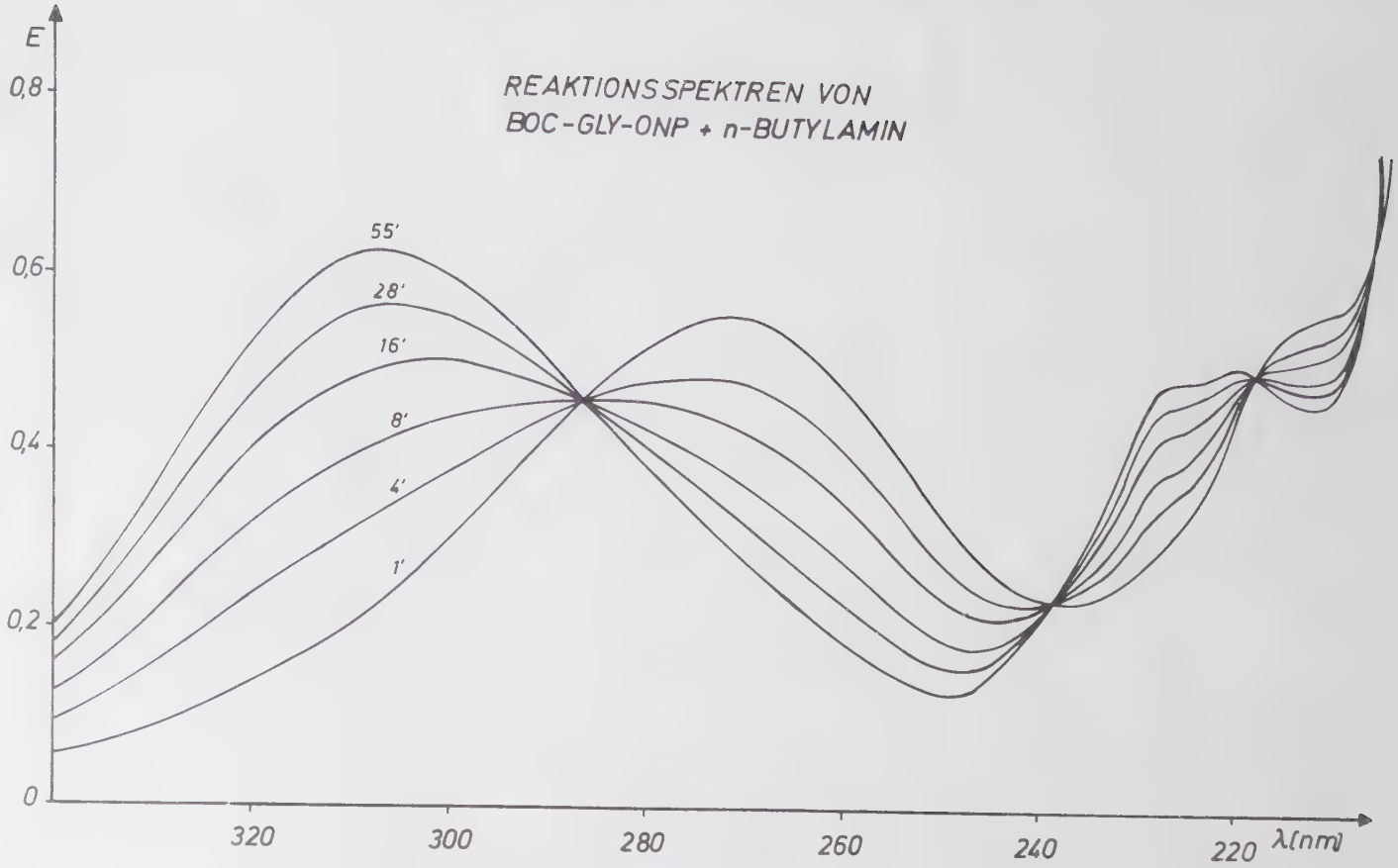


tert. Butoxycarbonyl-glycin-n-butylamid p-Nitrophenol

Wegen seines hervorragend spektroskopischen Verhaltens wurde Acetonitril als Lösungsmittel verwendet. - Das Reaktionsspektrum dieser Reaktion (s.Abb.1) zeigt drei (vier ?) Isosbesten. Die Reaktion

---

+) tert.Butoxycarbonyl-glycin-p-nitrophenolester wird üblicherweise Boc-gly-ONP abgekürzt



Tab. 1: Reaktionsspektren der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin (b.9·10^{-5}M) in Acetonitril (25,0 ± 0,2 °C).

dürfte daher "spektroskopisch einheitlich" (s.B)II.) sein. Lineare E-Diagramme verschiedenster Wellenlängenkombinationen beweisen dies. In Abb.5 ist nur die Wellenlänge 260 nm gegen die 310 nm aufgetragen. Der Mechanismus A+B → C+D steht hiermit nicht im Widerspruch.

Sind die Ausgangskonzentrationen der Reaktionspartner gleich, so können die Diagramme der Gl.(29) und (29b) konstruiert werden. Abb.2 zeigt das E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramm der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin in Acetonitril bei den Wellenlängen 310, 320 und 230 nm. Die Kurven sind linear und die Geraden sind unabhängig von der Wellen - länge. Die entsprechenden Kurven bei den Wellenlängen 270, 265 und 260 nm liegen im 2.Quadranten des Koordinatensystems. Die Kurven sind eben - falls Geraden; sie zeigen die gleiche Steigung wie die in Abb.2 . Die Extrapolation der Geraden auf die E_1-Achse ergeben die entsprechen- den $E_{\infty 1}$ - Werte.
Wird als Bezugspunkt E'_{01} für die Differenzenbildung $(E_1 - E'_{01})$ die 2., 3. ... m-te gemessene Extinktion eingesetzt und berücksichtigt, dass t' die Zeit ist, in der die Reaktion den Wert E'_{01} erreicht hat, so können, wenn die Wellenlänge konstant gehalten wird, die entsprechen- den E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Kurven in einem Diagramm konstruiert werden. Da mit zunehmender Reaktionsdauer die Konzentration des Reak- tionspartners A immer kleiner wird, muss die Steigung in diesem Dia- gramm mit zunehmendem t' grösser werden (vgl.Gl.(29) und berücksich- tige, dass in Abb.3 i.Vgl.zu Gl.(29) die Achsen vertauscht sind). Alle Geraden müssen sich in einem Punkt auf der E_1 - Achse - dem $E_{\infty 1}$ - Punkt - schneiden, da bei totalem Reaktionsumsatz E_1 immer gleich $E_{\infty 1}$ ist. Abb.3 zeigt dieses erwartete Verhalten.

Als Kriterien dafür, ob ein System nach dem Mechanismus A+B → C+D abläuft, wobei A und B gleiche Anfangskonzentrationen im Rahmen der Messgenauigkeit haben müssen, können also herangezogen werden :

1.) die Linearität und Parallelität der Kurven im E_1 , $(E_1-E'_{01})/(t-t')$ -Diagramm bei verschiedenen Wellenlängen und
2.) der gleiche Schnittpunkt der Geraden auf der E_1-Achse im E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramm, wenn die Wellenlänge konstant gehalten wird und für E'_{01} verschiedene Mess - werte eingesetzt werden.

Wie im Abschnitt IV. gezeigt wird, sind diese Kriterien recht empfind-

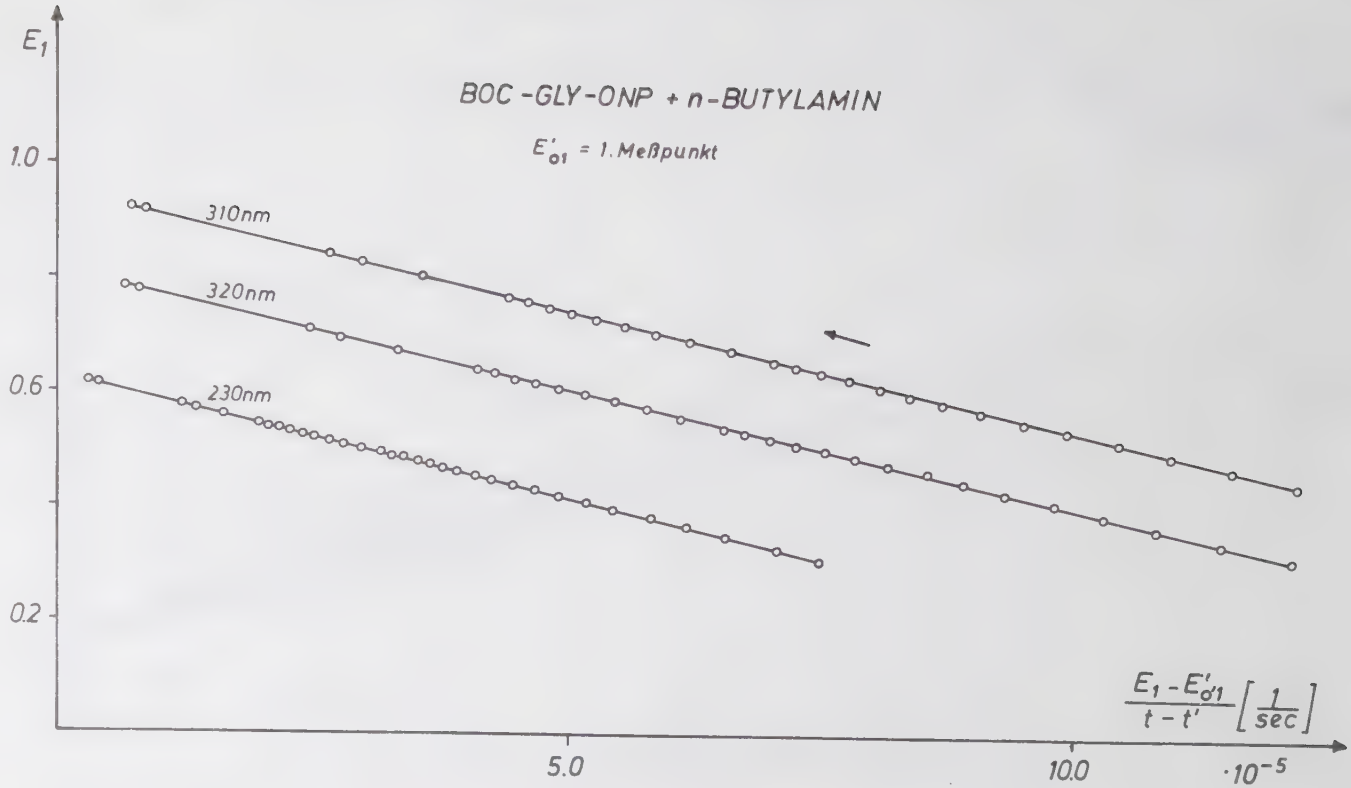


Abb. 2: Das $E_1,(E_1-E'_{01})/(t-t')$-Diagramm der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin bei den Wellenlängen 320, 310 und 230 nm. Reaktionsbedingungen: gleiche Ausgangskonzentrationen ($9\cdot10^{-5}$M), Acetonitril als Lösungsmittel (25,0 ± 0,2 °C).

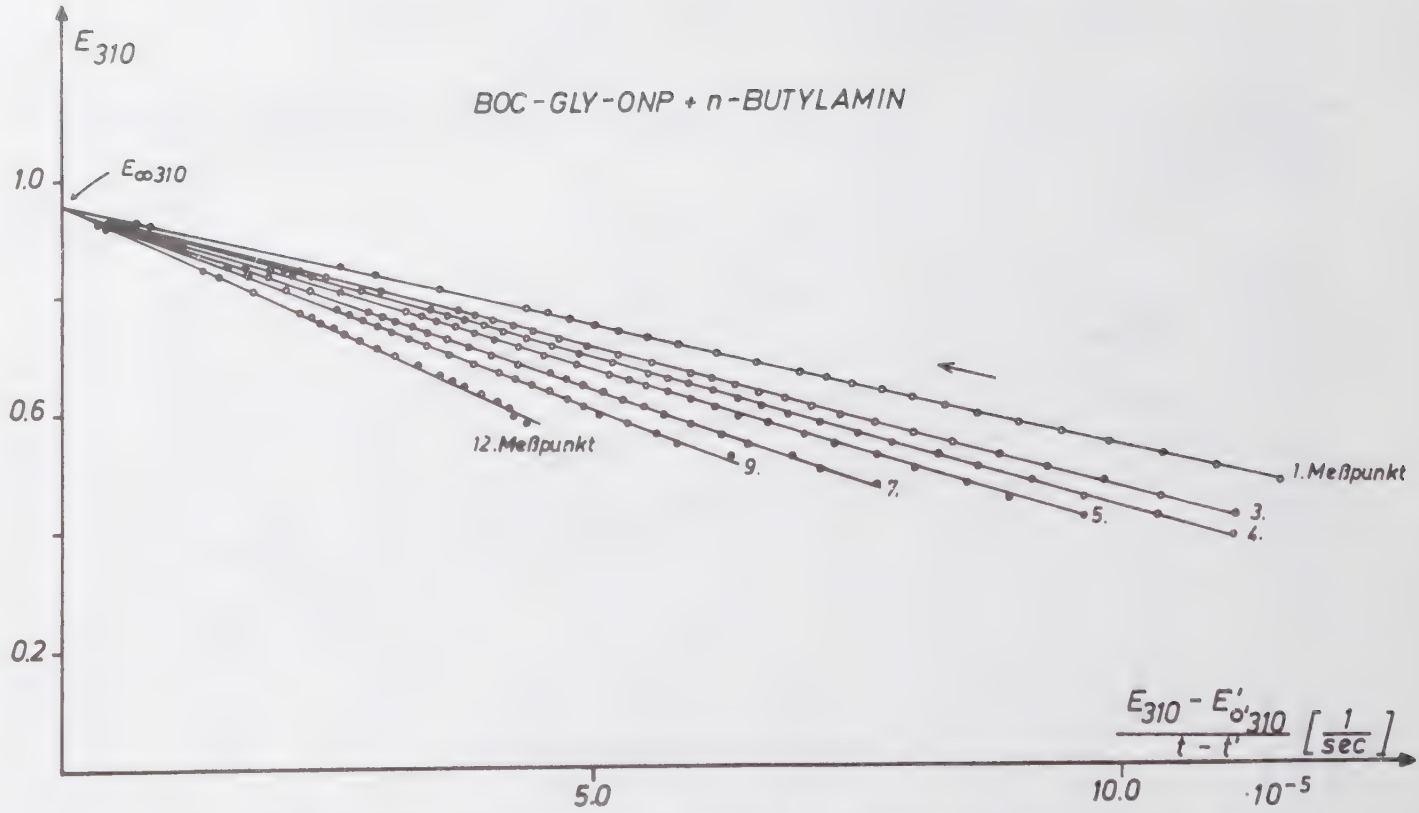


Abb. 3: $E_1,(E_1-E'_{01})/(t-t')$-Diagramm der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin bei der konstanten Wellenlänge 310 nm. Als Bezugspunkt für E'_{01} wurde die 1.,3.,4.,5., 7.,9. und 12. gemessene Extinktion eingesetzt. Reaktionsbedingungen wie in Abb.2

lich. Schwache Konkurrenzreaktionen machen sich in den oben erwähnten Diagrammen signifikant bemerkbar.
I.a. dauert es lange, bis bei Reaktionen mit gleichen Anfangskonzentrationen die Reaktion total abgelaufen ist. Mit Hilfe der Gl.(29) lässt sich $E_{\infty 1}$ sehr genau und leicht bestimmen, auch wenn die Reaktion nur bis zu 80-90%-igem Reaktionsumsatz verfolgt wurde.

Die Messdaten wurden mit Hilfe einer Grossrechenanlage verarbeitet. Das "EDTQ 1" -PRØGRAMM plottet das E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramm[+)] und berechnet k über q_1 (s.Gl.(27)). - Das "EDTQ 2" - PRØGRAMM berechnet k über Gl.(29) und (32). Bei n-Messdaten pro Wellenlänge (maximal 7) können nacheinander (n - 5) Messwerte als E'_{01} eingesetzt werden: jedes k im so entwickelten E_1, $(E_1-E'_{01})/(t-t')$ - Diagramm wird über die Streuung dieser Ausgleichsgeraden mit einem Gewicht versehen und hierüber der wahrscheinlichste k - Wert berechnet [8)]. Die $E_{\infty 1}$ - Werte wurden entsprechend ermittelt.

Die Geschwindigkeitskonstanten 2.Ordnung und die $E_{\infty 1}$ - Werte der Reaktion Boc-gly-ONP + n-Butylamin in Acetonitril als Lösungsmittel (25,0 ± 0,2 °C ; 9.10^{-5}M) ergaben nach dem "EDTQ 2" -PRØGRAMM ausgewertet:

Tabelle 1: Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin nach Gl.(29) ermittelt

Wellenlänge nm	Geschwindigkeitskonstante k nach "EDTQ 2"-PRØGRAMM ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$)	$E_{\infty 1}$ - Werte experimentell	$E_{\infty 1}$ - Werte nach "EDTQ 2"-PRØGRAMM
320	2,798	0,800	0,814
310	2,778	0,943	0,957
270	2,873	0,338	0,318
265	2,846	0,258	0,238
260	2,826	0,194	0,175
230	2,860	0,626	0,632

Aus Vergleichsgründen wurde bei den k - Werten die 3. Stelle nach dem Komma angegeben. Die Geschwindigkeitskonstanten differieren um

---

[+)] Herrn Dr.G.Gauglitz vom Physikal.-chem.Inst.der Universität Tübingen danke ich herzlich für die Konstruktion des Plotterprogrammes.

1,9% vom Durchschnittswert.
Die berechneten $E_{\infty 1}$ - Werte stimmen mit den experimentell gefundenen relativ gut überein.

2.2. Das $1/(E_{\infty 1} - E_1)$, t - Diagramm

Für den Fall, dass $a_o = b_o$ ist, erhält man aus Gl.(25) unter Berücksichtigung von Gl.(23) :

$$\frac{1}{E_{\infty 1} - E_1} = \left(\frac{k}{E_{\infty 1} - E_{01}} \right) a_o \, t + \frac{1}{E_{\infty 1} - E_{01}} \qquad (33)$$

Ist $E_{\infty 1}$ bekannt, so kann k aus der Steigung der Geraden im $1/(E_{\infty 1} - E_{01})$, t - Diagramm ermittelt werden. Hierbei muss E_{01} nicht bekannt sein, da es aus dem Ordinatenabschnitt bestimmt werden kann. - Mit diesem Diagramm kann die Unschärfe des $E_{\infty 1}$ - Wertes erkannt werden. Ferner kann die wahre Extinktion zur Zeit t = 0 erhalten werden. Dies kann dann von Bedeutung sein, wenn die Reaktion am Anfang sehr schnell abläuft und damit eine Extrapolation der Extinktion - Zeit - Kurve gegen t = 0 nur ungenau möglich ist. Werden kinetische Grössen aus den Konzentrationen bestimmt, muss E_{01} genau bekannt sein, wie im Abschnitt III.3. gezeigt wird.

Abb.4 zeigt das Diagramm der Gl.(33), angewendet auf die Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin. Als $E_{\infty 1}$ wurden die Werte eingesetzt, die mit Hilfe der Formalen Integration nach Gl.(47) bzw. (49) im Abschnitt III.5. bestimmt wurden. - Nähert sich E_1 dem $E_{\infty 1}$ - Wert, so machen sich die relativen Fehler in $1/(E_{\infty 1} - E_1)$ stärker bemerkbar: die Abweichung vom linearen Verlauf wird stärker, wie in Abb.4 zu sehen ist.
Die Extinktionen zur Zeit t = 0 (E_{01}) wurden nach Gl.(33) und mit dem "SYNCHRØ" - PRØGRAMM bestimmt. In diesem werden durch die Extinktions - Zeit - Kurven Ausgleichsparabeln 2.Ordnung gelegt und hieraus E_{01} bestimmt. Tab.2 zeigt die nach diesen beiden Methoden erhaltenen E_{01} - Werte und die bei den verschiedenen Wellenlängen bestimmten Geschwindigkeitskonstanten.

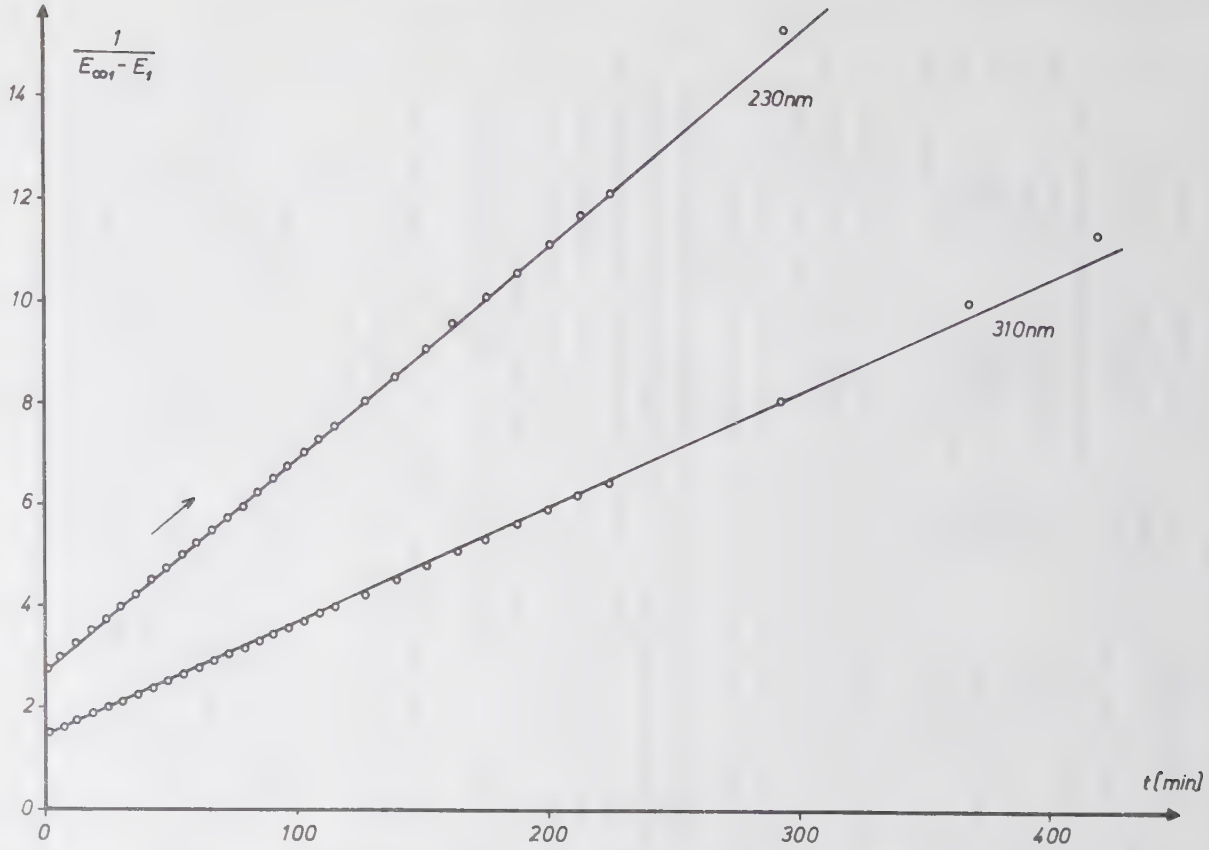


Abb. 4: $1/(E_{\infty 1}-E_1)$,t-Diagramm der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin.Reaktionsbedingungen wie bei Abb.2

Tabelle 2 : Bestimmung von k nach Gl.(33) bei der Reaktion Boc-gly-ONP + n-Butylamin und der Vergleich der nach verschiedenen Methoden bestimmten E_{01} - Werte

Wellenlänge nm	Geschwindigkeitskonstante k ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$)	$E_{\infty 1}$ aus Gl.(49)	E_{01} aus "SYNCHRØ"-PRØGRAMM	E_{01} aus Gl.(33)
320	3,007	0,8010	0,0761	0,0549
310	2,985	0,9430	0,1498	0,1283
270	3,149	0,3300	0,8903	0,9101
265	3,134	0,2510	0,8676	0,8955
260	3,191	0,1910	0,7954	0,8277
230	3,018	0,6270	0,2446	0,2341

Aus Vergleichsgründen wurden hier $E_{\infty 1}$ und E_{01} auf 4 Dezimalstellen und k auf 3 Dezimalstellen angegeben. - Da zu Reaktionsbeginn die Reaktion relativ schnell abläuft, ist es möglich, dass das E_{01} über das "SYNCHRØ" - PRØGRAMM mit einem grösseren Fehler behaftet ist als die über das Diagramm der Gl.(33) ermittelten E_{01}- Werte.

Die Geschwindigkeitskonstanten liegen grundsätzlich etwas zu hoch. Als wahrscheinlichster Wert für k wird für die Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin 2,8 ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$) angenommen, wenn die Ergebnisse der Tab.1 und Tab.3 (Abschnitt III.4.) zugrunde gelegt werden. Der Grund hierfür dürfte darin liegen, dass kleine Fehler im Wert $E_{\infty 1}$ sich weniger im linearen Verlauf des Diagramms der Gl.(33) bemerkbar machen als vielmehr in der Steigung der Geraden und damit in k.
Die Geschwindigkeitskonstanten wurden über die Steigungen der Ausgleichsgeraden der Diagramme der Gl.(33) bestimmt.

3. Bestimmung der Konzentrationen über das E-Diagramm[9)]

Bei Reaktionen des Typs A+B $\rightleftharpoons$ C+D lassen sich die Konzentrationen aller bei der Reaktion beteiligten Stoffe nach Gl.(32) unter Verwendung einer Wellenlänge bestimmen, wenn $E_{\infty 1}$ und E_{01} bekannt sind. Die Gl.(32) besitzt den Vorteil, dass alle Stoffe absorbieren können und die Konzentrationen unabhängig von den Extinktionskoeffizienten erhältlich sind. - Eine weit verbreitete Methode ist es, die Konzentrationen über die Extinktionskoeffizienten zu bestimmen. Da aber

diese nur ungenau bestimmt werden können, treten zusätzliche Fehler in der kinetischen Analyse auf. Absorbieren alle Stoffe, so ist die Anwendung dieser Methode abzulehnen. Aus diesem Grunde werden in diesem Falle solche Wellenlängen ausgesucht, bei denen nur ein oder höchstens zwei Stoffe absorbieren. Das bedeutet aber oft, dass die Messbedingungen nicht optimal sind, weil die Extinktionsänderung während der Reaktion nicht maximal ist.

Die Konzentrationen können auch wie folgt aus den E - Diagrammen errechnet werden : in Abb.5 ist das E - Diagramm der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin (Reaktionsbedingungen wie in Abb.2) der Wellenlängenkombination 260 und 310 nm angegeben. Nach Gl.(32) ist die Strecke $|w + x| = |E_{\infty 1} - E_{01}|$ ein Mass für 100%-igen Reaktionsumsatz. Es gilt nach dem I.Strahlensatz die Beziehung :

$$\frac{w}{x} = \frac{u}{v} \tag{34}$$

Es lassen sich also auch die Konzentrationen aus den entsprechenden Streckenverhältnissen der Messgerade im E - Diagramm entnehmen. Ohne die Allgmeingültigkeit einzuschränken, sei angenommen, dass

$$b_o \geqslant a_o \tag{35}$$

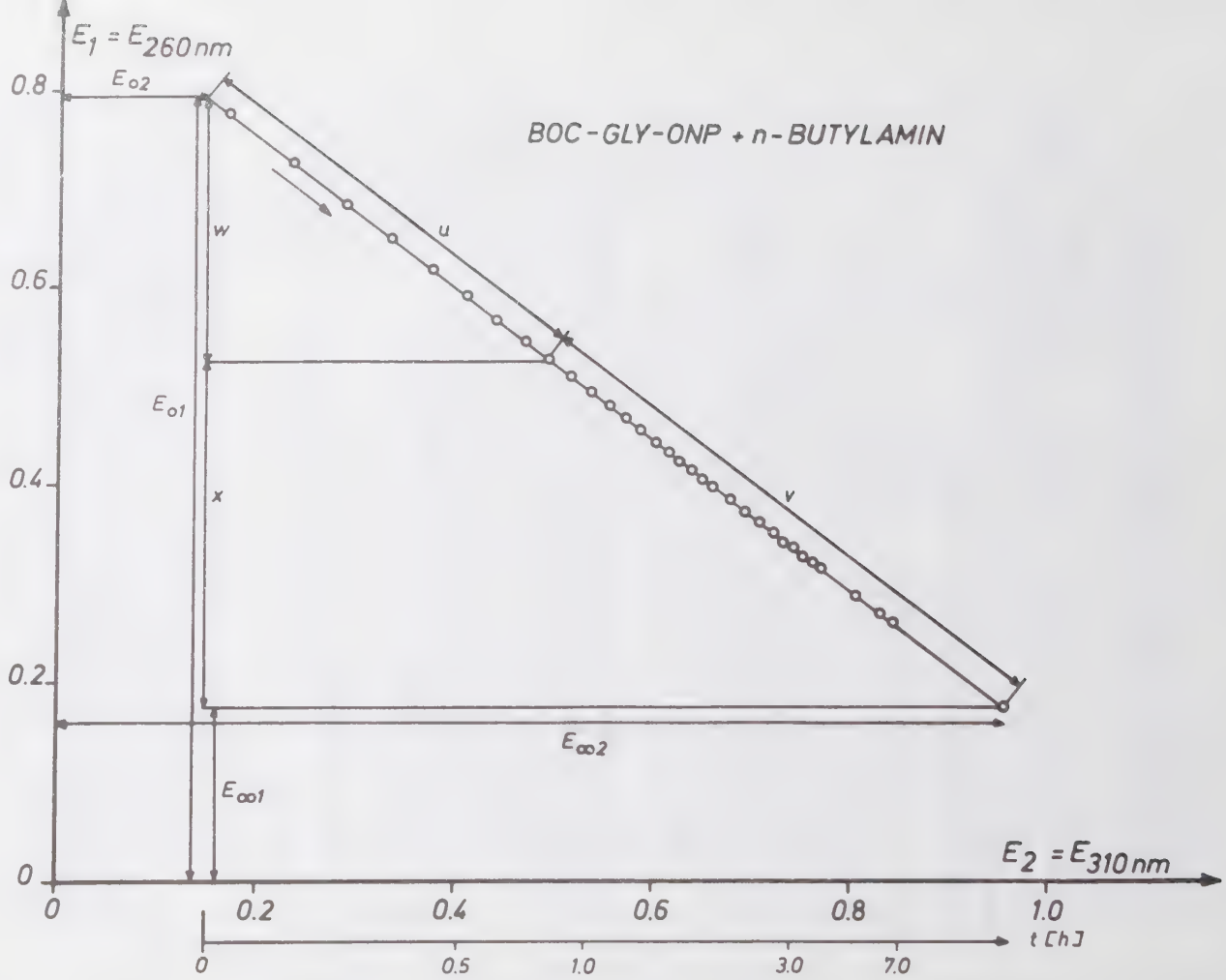
ist. Mit Gl.(34) gilt dann für die Konzentration a des Stoffes A zur Zeit t :

$$a = \left(\frac{v}{u + v} \right) a_o = \left(\frac{x}{w + x} \right) a_o \tag{36}$$

Entsprechend gilt für die Stoffe C und D :

$$c = d = \left(\frac{u}{u + v} \right) a_o = \left(\frac{w}{w + x} \right) a_o \tag{37}$$

Gl.(36) und (37) haben i.Vgl. zu Gl.(32) den Vorteil, dass Fehler in den Extinktionen durch gegenseitiges Auftragen korrigiert werden können, wenn die Ausgleichsgerade wie im "FØRMALIN" - PRØGRAMM (s.Abschnitt V.) durch die Messpunkte konstruiert wird.


$E_1 = E_{260\,nm}$
E_{o2}
0.8
0.6
0.4
0.2
0
BOC-GLY-ONP + n-BUTYLAMIN
w
u
v
x
E_{o1}
$E_{\infty 2}$
$E_{\infty 1}$
$E_2 = E_{310\,nm}$
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
t [h]
0
0.5
1.0
3.0
7.0

4. Lösung der Konzentrations - Differentialgleichung mit Hilfe der Formalen Integration [10,11,12]

Für Reaktionen vom Mechanismus A+B → C+D gelten die Konzentrations-Differentialgleichungen :

$$\frac{da}{dt} = - k\, a\, b \qquad (a_o \neq b_o) \tag{38}$$

$$\frac{da}{dt} = - k\, a^2 \qquad (a_o = b_o) \tag{39}$$

Die geschlossene Integration führt zu den bekannten Lösungen :

$$\ln \left(\frac{a}{b} \cdot \frac{b_o}{a_o} \right) = - (b_o - a_o)\, k\, t \qquad (a_o \neq b_o) \tag{38b}$$

$$\frac{1}{a} - \frac{1}{a_o} = k\, t \qquad (a_o = b_o) \tag{39b}$$

Diese Fallunterscheidung von $a_o = b_o$ und $a_o \neq b_o$ erübrigt sich, wenn auf Gl.(38) die Methode der Formalen Integration angewendet wird. Mit der Definition und Beziehung :

$$\Delta \equiv a - b = a_o - b_o \tag{40}$$

wird aus Gl.(38) :

$$\frac{da}{a} = - k\, b\, dt = - k\, (a - \Delta)\, dt \tag{41}$$

Die Integration von Gl.(41) mit den Integrationsgrenzen a_o und a bzw. t = 0 und t führt zu :

$$\ln \frac{a}{a_o} = k\, \Delta \cdot t - k \int_{t=o}^{t} a\, dt \tag{42}$$

Nach Division von Gl.(42) mit t gibt die Steigung der Geraden im y , x - Diagramm die gesuchte Geschwindigkeitskonstante.

$$\frac{\ln \frac{a}{a_o}}{t} = k \Delta - k \frac{\int_{t=o}^{t} a\, dt}{t} \tag{43}$$

$$\equiv y = k' - k\, x$$

Im Fall $a_o = b_o$ liegt im y , x - Diagramm eine Nullpunktsgerade vor, im Fall $a_o \neq b_o$ eine Gerade mit dem entsprechenden Ordinatenabschnitt.
Die Konzentrationen können über Gl.(32) oder (36) ermittelt werden. - Die Grössen $\int_{t_0}^{t} a\,dt$ können mit numerischen Methoden genau bestimmt werden. Dabei ist der Einsatz einer Grossrechenanlage naheliegend.

Das "FØRMALIN" - PRØGRAMM errechnet k nach Gl.(43). Es ist in der Sprache FØRTRAN IV (USASI) geschrieben. Im Abschnitt V. wird es kurz beschrieben.

Abb.6 zeigt das y,x - Diagramm der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin bei der Wellenlänge 260 nm ausgewertet. Da die Ausgangskonzentrationen von A und B gleich sind, läuft die Gerade durch den Ursprung des Koordinatensystems.

Die Tab.3 zeigt die Geschwindigkeitskonstanten, die bei den verschiedenen Wellenlängen ermittelt wurden. Da die Konzentrationen über das E - Diagramm bestimmt wurden und die Wellenlänge 310 nm als Referenzwellenlänge gewählt wurde, kann k bei 310 nm nicht angegeben werden.

Tabelle 3 : Bestimmung von k nach Gl.(43) bei der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin

Wellenlänge nm	Geschwindigkeitskonstante k ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$)
320	2,785
310	Referenz f.E-Diagr.
270	2,805
265	2,784
260	2,791
230	2,783

Aus Vergleichsgründen wurde k wieder auf die 3. Dezimalstelle angegeben. - Die Geschwindigkeitskonstanten unterscheiden sich um 0,78% vom gewichteten Mittelwert von k. Die Methode der Formalen Integration, angewendet auf die Konzentrations-Differentialgleichung, liefert k - Werte, die in guter Uebereinstimmung mit denen der Tab.1 stehen.

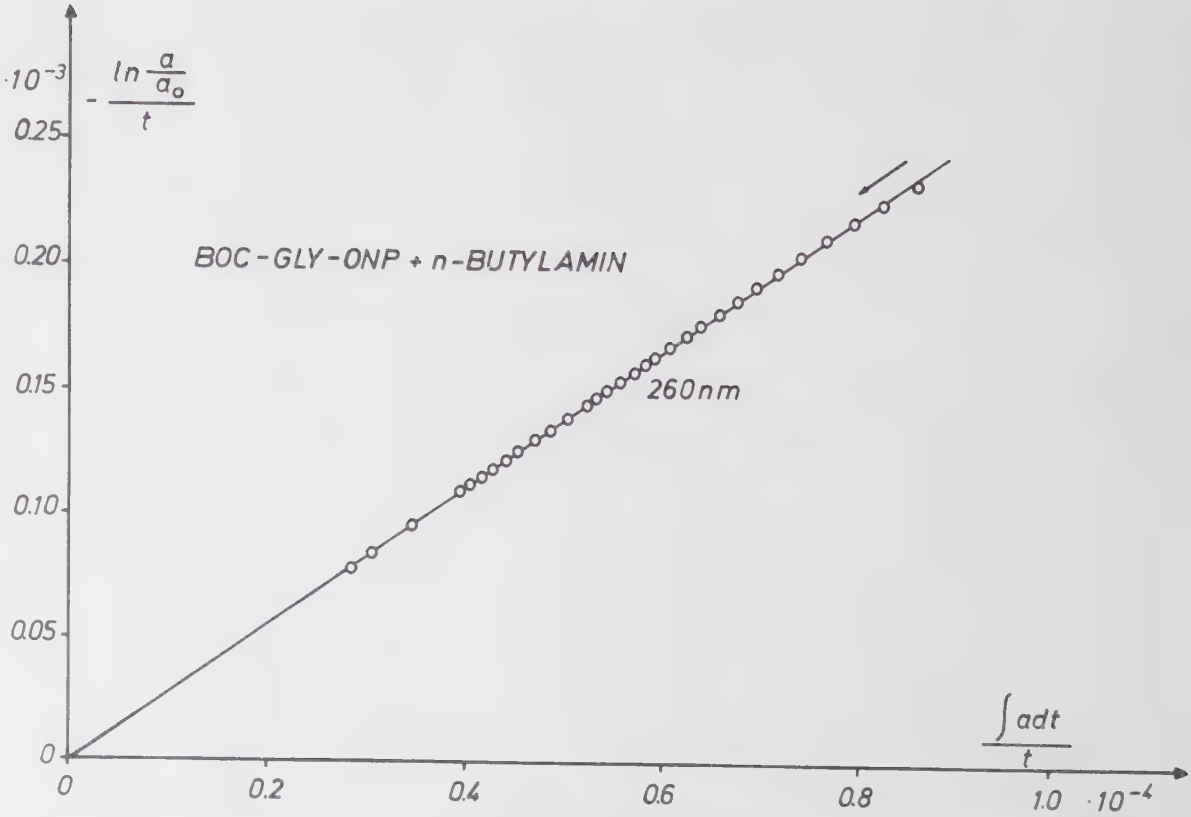


Abb. 6: Das y,x-Diagramm der Gl.(43) der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin. Reaktionsbedingungen wie bei Abb.2

Die Gl.(43) hat noch folgenden Vorteil : ist unter Berücksichtigung der Gl.(35) die Startkonzentration von B und damit auch b unbekannt, so kann k nach Gl.(38b) nicht bestimmt werden. Gl.(43) ist unabhänig von b. Ueber den Ordinatenabschnitt lässt sich b_o mit Gl.(40) bestimmen. Diese Art der b_o-Bestimmung ist dann von Interesse, wenn z.B. aus Gründen der Stabilität eines Stoffes (z.B. empfindliche Mercaptane) b_o nur ungenau bekannt ist.

5. Bestimmung von $E_{\infty 1}$ und $\tilde{E}_{\infty 1}$

Gl.(21) kann mit der Definition

$$\tilde{E}_{\infty 1} = b_o\, q_1 + E_{01} \tag{44}$$

vereinfacht werden zu :

$$\frac{dE_1}{dt} = \frac{k}{q_1}\,\left(E_{\infty 1} - E_1 \right)\left(\tilde{E}_{\infty 1} - E_1 \right) \tag{45}$$

Im Fall $b_o \geqslant a_o$ gibt $\tilde{E}_{\infty 1}$ eine nicht messbare Grösse an. Ist $a_o = b_o$, so ist $\tilde{E}_{\infty 1} = E_{\infty 1}$ und aus Gl.(45) wird Gl.(24).
Da für die Konstruktion der nachfolgenden Diagramme $E_{\infty 1}$ und z.T. auch $\tilde{E}_{\infty 1}$ benötigt werden, sollen hier Verfahren für ihre Bestimmung angegeben werden.

Gl.(45) kann auf die allgemeine Form gebracht werden :

$$\frac{dE_1}{dt} = Z_1 + Z_2\, E_1 + Z_3\, E_1^2 \tag{46}$$

Die Konstanten Z_1 , Z_2 und Z_3 können mit Hilfe der Formalen Integration erhalten werden. In Lit. 10) und 13) wird dieses Verfahren genau beschrieben. $E_{\infty 1}$ und $\tilde{E}_{\infty 1}$ können berechnet werden, indem Gl.(46) null gesetzt wird:

$$E_{\infty 1} = \frac{- Z_2 - \sqrt{Z_2^2 - 4\, Z_3\, Z_1}}{2\, Z_3} \tag{47}$$

$$\tilde{E}_{\infty 1} = \frac{-Z_2 + \sqrt{Z_2^2 - 4 Z_1 Z_3}}{2 Z_3} \qquad (47b)$$

Aus Gl.(46) und (45) lässt sich ferner die Beziehung ableiten:

$$E_{\infty 1} = \frac{Z_1}{Z_3 \tilde{E}_{\infty 1}} \qquad (48)$$

Im Fall $a_o = b_o$ ($E_{\infty 1} = \tilde{E}_{\infty 1}$) gilt, wenn die Koeffizienten der Summanden der Gl.(24) und (46) verglichen werden :

$$E_{\infty 1} = \overset{+}{(-)} \sqrt{\frac{Z_1}{Z_3}} = -\frac{Z_2}{2Z_3} \qquad (49)$$

Beide Quotienten müssen denselben $E_{\infty 1}$ - Wert geben.
Die erste Beziehung in Gl.(49) ist identisch mit Gl.(48), wenn berücksichtigt wird, dass $E_{\infty 1} = \tilde{E}_{\infty 1}$ ist.

Für die Reaktionen Boc-gly-ONP mit den Aminkomponenten n-Butylamin und tert.Butyl-glycinester-hydrochlorid wurde $E_{\infty 1}$ nach Gl.(49) bestimmt.(Die Reaktion mit tert.Butyl-glycinester·HCl wird in Abschnitt IV.1. genau beschrieben). Die Konstanten Z_1 , Z_2 , Z_3 wurden nach dem "KINALYSE"-PROGRAMM von H.J.Niemann[10] ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab.4 zusammengestellt.

Die $E_{\infty 1}$- Werte bei der n-Butylamin - Reaktion stimmen untereinander gut überein. Bei der tert.Butyl-glycinester - Reaktion ist die Abweichung z.T.grösser. Der Grund dürfte in folgendem liegen: die n-Butylamin - Reaktion läuft exakt nach dem Mechanismus A+B → C+D ab, wohingegen bei der tert.Butyl-glycinester - Reaktion geringe Nebenreaktionen auftreten, wie im Abschnitt IV.1. und IV.6. gezeigt wird.

Mit Gl.(49) kann also nicht nur $E_{\infty 1}$ sehr genau bestimmt werden, sondern $E_{\infty 1}$ kann auch als Kriterium dafür herangezogen werden, ob die Reaktion nach dem Mechanismus A+B → C+D ($a_o = b_o$) abläuft.

Wird $E_{\infty 1}$ in Tab.4 nach Gl.(47) berechnet, so ist der Fehler vom experimentell gefundene Wert grösser. Das liegt am Wurzelausdruck der Gl.(47) und (47b).Im Fall $a_o = b_o$ ist die Gl.(47) mit Gl.(49) (zweite Beziehung) nur dann identisch, wenn die Wurzel in Gl.(47) null ist, d.h.:

Tabelle 4 : Bestimmung der $E_{\infty 1}$ - Werte nach Gl.(49) bei den Reaktionen Boc-gly-ONP mit n-Butylamin (gleiche Ausgangskonzentrationen: $9 \cdot 10^{-5}$M) und Boc-gly-ONP mit tert.Butyl-glycinester·HCl (gleiche Ausgangskonzentrationen: $9 \cdot 10^{-4}$M). Reaktionstemperatur: 25,0 ± 0,2 °C

Wellenlaenge nm	$E_{\infty 1}$ - Werte n - Butylamin - Reaktion experimentell	$\sqrt{Z_1/Z_3}$	$-Z_2/2Z_3$	tert.Butyl-glycinester·Hcl-Reakt. nach Gl.(29)	$\sqrt{Z_1/Z_3}$	$-Z_2/2Z_3$
320	0,800	0,801	0,799	0,830	0,808	0,802
310	0,943	0,943	0,941	0,954	0,942	0,939
270	0,338	0,330	0,327	0,323	0,385	0,370
265	0,258	0,251	0,247	0,251	0,320	0,299
260	0,194	0,191	0,185	0,192	0,280	0,252
230	0,626	0,627	0,626	0,631	0,603	0,599

$$Z_2 = \pm 2\sqrt{Z_1 Z_3} \qquad (50)$$

ist. Da aber die Wurzel nicht exakt null werden kann, bedingt durch Messfehler, treten zusätzliche Glieder in Gl.(47) auf.

Setzt man Gl.(50) in die zweite Beziehung der Gl.(49) ein, so erhält man die erste Beziehung aus Gl.(49). - Mit Gl.(50) kann $E_{\infty 1}$ in Gl.(48) auch als Funktion von Z_2 und Z_3 bzw. Z_1 und Z_2 ausgedrückt werden.

Die Bestimmung von $\tilde{E}_{\infty 1}$ ist wesentlich kritischer, wie sich herausgestellt hat. Es wurde versucht, $\tilde{E}_{\infty 1}$ nach Gl.(47b) bei der n-Butylamin - Reaktion (n-Butylamin = Stoff A) unter der Reaktionsbedingung $2a_o = b_o$ zu bestimmen. Es stellte sich heraus, dass diese Grösse mit dieser Methode nur sehr ungenau ermittelt werden kann. Bei der Auswertung der Reaktion von Boc-leu-ONP mit L-Val-tert.butylester·HCl, die geringe Nebenreaktionen zeigt, wurden die Wurzelglieder in Gl.(47b) z.T. negativ.

Der Grund hierfür liegt im folgenden:
Trägt man $dE_1/dt = \dot{E}_1$ gegen E_1 auf, so ist die Kurve nach Gl.(46) eine Parabel, die je nach dem Vorzeichen von q_1 (vergl.Gl.(21)) nach oben oder unten geöffnet ist. Der Schnittpunkt der Parabel mit der Abszisse liefert $E_{\infty 1}$ bzw. $\tilde{E}_{\infty 1}$ (s.Abb.7, Kurve a).Ueber die Messpunkte, die zwischen E_{01} und $E_{\infty 1}$ liegen, muss auf $\tilde{E}_{\infty 1}$ extrapoliert werden. Je weiter $E_{\infty 1}$ von $\tilde{E}_{\infty 1}$ entfernt liegt, umso grösser ist der Fehler von $\tilde{E}_{\infty 1}$.
Im Fall $a_o = b_o$ fallen die Punkte $E_{\infty 1}$ und $\tilde{E}_{\infty 1}$ zusammen (s.Abb.7, Kurve b). Die Bestimmung von $E_{\infty 1}$ ist hier weniger problematisch.

$\tilde{E}_{\infty 1}$ kann auch anders erhalten werden, wenn bei der Reaktion $A+B \rightarrow C+D$ nur ein Reaktionspartner und ein Entstehungsprodukt, z.B. A und C, absorbieren. Wenn der Fall angenommen wird, dass $2a_o = b_o$ ist, so gilt für $\tilde{E}_{\infty 1}$:

$$\tilde{E}_{\infty 1} = 2E_{\infty 1} - E_{01} \qquad (51)$$

Nach den Gl.(23) und (44) gilt nämlich :

$$\tilde{E}_{\infty 1} = 2E_{\infty 1} - E_{01} = b_o q_1 + E_{01} = 2q_1 a_o + 2E_{01} - E_{01} = 2q_1 a_o + E_{01} = q_1 b_o + E_{01}$$

w.z.b.w.

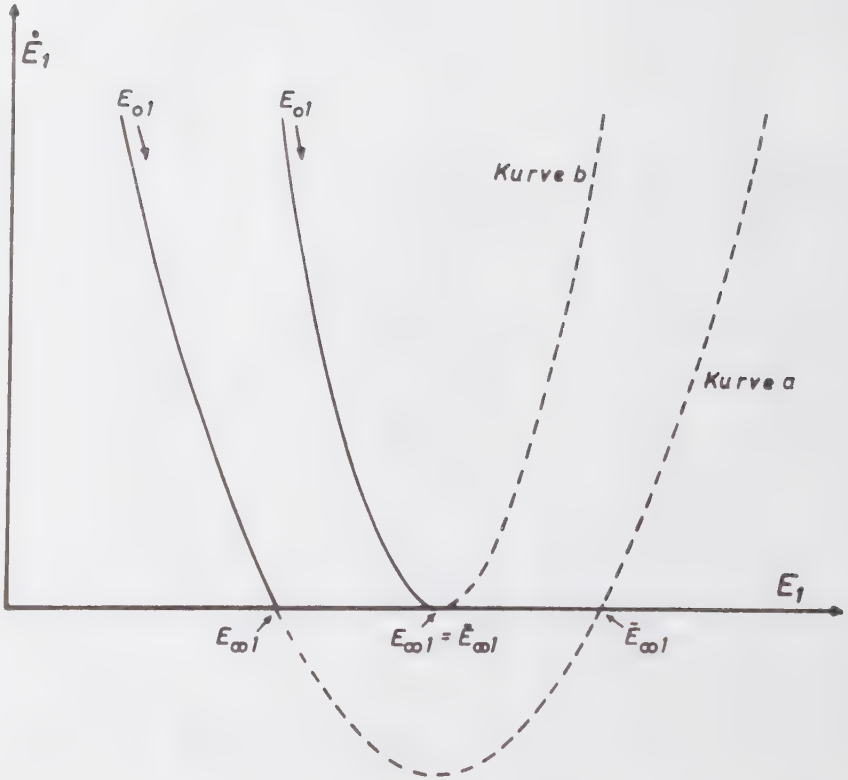


Abb. 7: $\dot{E}$,t-Diagramm der Gl.(46). (s.Text)

Allgemein gilt, wenn zwischen a_o und b_o die Beziehung besteht:

$$n\, a_o = b_o \tag{52}$$

$$\tilde{E}_{\infty 1} = n\, E_{\infty 1} - (n-1)\, E_{01} \tag{53}$$

I.Ggs. zu Gl.(47b)muss also, wenn die Stoffe A und C absorbieren, das Verhältnis von b_o zu a_o zusätzlich bekannt sein (z.B.über Gl.(43)). Mit Hilfe von Gl.(53) kann $\tilde{E}_{\infty 1}$ genau bestimmt werden. Da bei den hier untersuchten Reaktionen nur A und C absorbieren, wurden für die unten diskutierten Diagrammen, die $\tilde{E}_{\infty 1}$ enthalten, $\tilde{E}_{\infty 1}$ ausschliess - lich nach Gl.(53)errechnet.

6. Geschlossene Integrationsform der Extinktions-Differential - gleichung

Gl.(45) gibt die allgemeine Form der Extinktions-Differentialgleichung der Reaktion $A+B \rightarrow C+D$ $(a_o \neq b_o)$ an.Separiert man diese Differential-gleichung nach ihren Variablen, führt die Produktintegration aus und berücksichtigt die Beziehungen (23) und (44), so gilt :

$$\ln\left(\frac{\tilde{E}_{\infty 1} - E_1}{E_{\infty 1} - E_1}\right) = \ln\left(\frac{\tilde{E}_{\infty 1} - E_{01}}{E_{\infty 1} - E_{01}}\right) + (\tilde{E}_{\infty 1} - E_{\infty 1})\,\frac{k}{q_1}\,t$$

$$= \ln\frac{b_o}{a_o} + (b_o - a_o)\,k\,t \tag{54}$$

Sind $E_{\infty 1}$, $\tilde{E}_{\infty 1}$ und a_o bekannt, so kann k aus der Steigung der Gera-den im $\ln((\tilde{E}_{\infty 1} - E_1)/(E_{\infty 1} - E_1))$, t - Diagramm erhalten werden. E_{01} kann über den Ordinatenabschnitt nur dann genau bestimmt werden, wenn $\tilde{E}_{\infty 1}$ und $E_{\infty 1}$ sehr genau bekannt sind.

Die Steigung und der Ordinatenabschnitt der Geraden im Diagramm der Gl.(54)sind unabhängig von der Wellenlänge.

Die Gl.(54) und (38b) sind formal gleich, wie entsprechend die Gl.(33) und (39b).

Gl.(54) wurde für die Auswertung der Reaktion Boc-gly-ONP (10^{-4}M) mit n-Butylamin ($2\cdot10^{-4}$M ; 25,0 $\pm$ 0,2 ^{o}C) herangezogen. Lösungsmittel ist wieder Acetonitril. Da die Reaktion wegen des Ueberschusses an dem

sehr reaktiven n-Butylamin rasch abläuft, wurde die Reaktion nur bei den Wellenlängen 320, 310 und 270 nm verfolgt.

Abb.8 zeigt die Kurve dieser Reaktion bei der Wellenlänge 320 nm.

In Tab.5 sind die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten und die für die Auswertung eingesetzten $E_{\infty l}$ - und $\tilde{E}_{\infty l}$ -Werte angegeben. $E_{\infty l}$ wurde experimentell festgestellt und $\tilde{E}_{\infty l}$ nach Gl.(53) bzw. (51) ermittelt.

Tabelle 5 : Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion Boc-gly-ONP (10^{-4}M) mit n-Butylamin ($2 \cdot 10^{-4}$M) nach Gl.(54) ermittelt

Wellenlänge nm	Geschwindigkeitskonstante k ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$)	$E_{\infty l}$ experimentell	$\tilde{E}_{\infty l}$ nach Gl.(51)
320	2,717	0,966	1,809
310	2,681	1,134	2,044
270	2,755	0,352	-0,316

Aus Vergleichsgründen wird k wieder auf die 3.Dezimalstelle angegeben.-

$\tilde{E}_{\infty l}$ ist bei der Wellenlänge 270 nm deswegen negativ, weil dort die Extinktion während der Reaktion ständig abnimmt (s.Abb.1) und die Definitionsgleichung (44) gilt.

Die Grössen der Geschwindigkeitskonstanten der Tab.5 sind in guter Uebereinstimmung mit denen von Tab1 und 3. - Das bedeutet, dass sich der Wert $\tilde{E}_{\infty l}$ nach Gl.(53) genau genug berechnen lässt. - Die Bestimmung von $E_{\infty l}$ kann hier auch experimentell erfolgen, da ein Reaktionspartner im Ueberschuss vorliegt und die Reaktionszeit für totalen Reaktionsumsatz abgewartet werden kann.
Zur Bestimmung von k in Tab.5 wurde wieder die Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Ausgleichsgerade) verwendet.

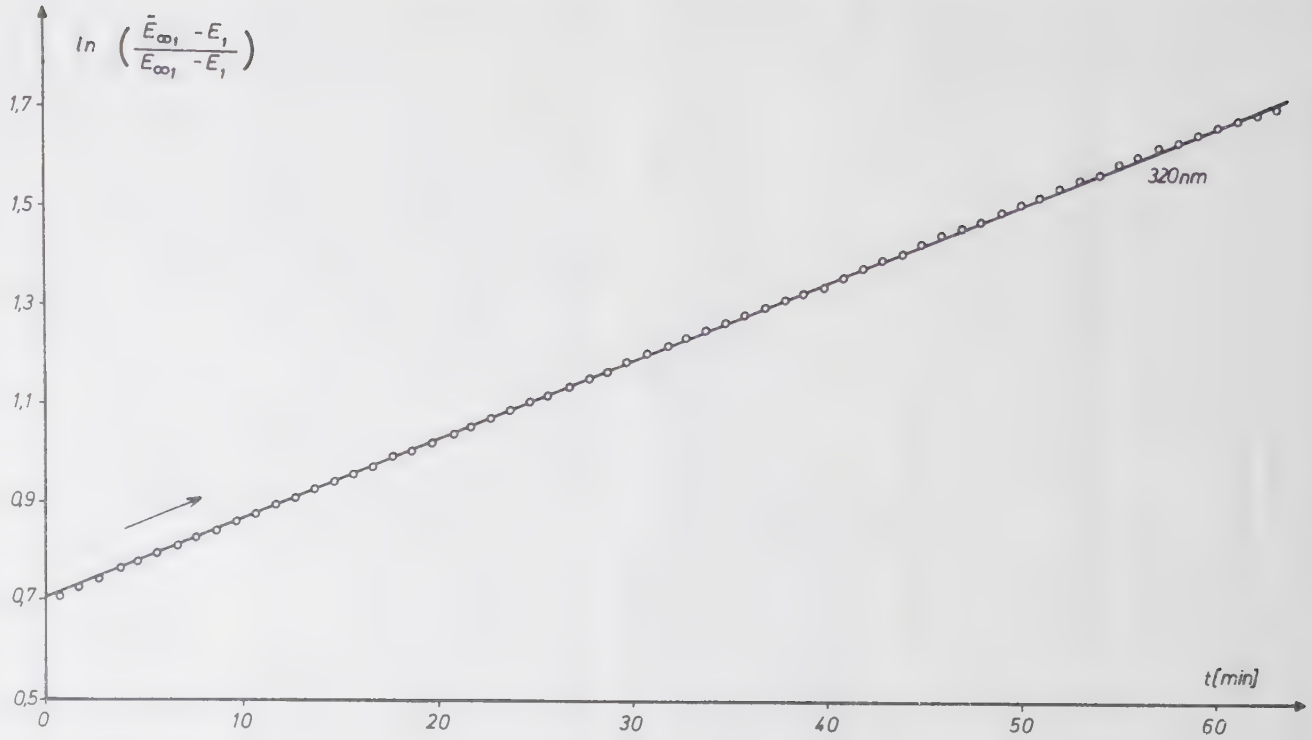


Abb. 8: Das ln $(\tilde{E}_{\infty_1}-E_1)/(E_{\infty_1}-E_1)$),t-Diagramm der Reaktion Boc-gly-ONP (10^{-4}M) mit n-Butylamin ($2\cdot10^{-4}$M) in Acetonitril (25,0 ± 0,2 °C). Wellenlänge: 320 nm

7. Lösung der Extinktions-Differentialgleichung mit Hilfe der Formalen Integration

Gl.(45) kann in der Form geschrieben werden :

$$\frac{dE_1}{dt} = \frac{k}{q_1} \left(E_{\infty 1} \tilde{E}_{\infty 1} - (E_{\infty 1} + \tilde{E}_{\infty 1}) E_1 + E_1^2 \right)$$

Integriert man diese Gleichung formal und wählt die Integrationsgrenzen E_{01} und E_1 bzw. t = 0 und t und dividiert die Gleichung mit t, so erhält man :

$$\frac{E_1 - E_{01}}{t} = \frac{\Delta E_1}{t} = \frac{k}{q_1} \left(E_{\infty 1} \tilde{E}_{\infty 1} - (E_{\infty 1} + \tilde{E}_{\infty 1}) \frac{\int_{t=0}^{t} E_1 \, dt}{t} + \frac{\int_{t=0}^{t} E_1^2 \, dt}{t} \right) \qquad (55)$$

mit $q_1 = \frac{E_{\infty 1} - E_{01}}{a_0}$

Trägt man bei bekannten $E_{\infty 1}$ und $\tilde{E}_{\infty 1}$ $\Delta E_1/t$ gegen den Klammerausdruck von Gl.(55) auf, so läuft im Falle einer Reaktion A+B → C+D die Gerade durch den Ursprung des Koordinatensystems. Das trifft auch für den Fall $E_{\infty 1} = \tilde{E}_{\infty 1}$ ($a_0 = b_0$) zu.

Der Vorteil dieser Methode liegt im folgenden : in der Kinetik werden bevorzugt solche Diagramme konstruiert, die im Falle des linearen Verlaufs einen angenommenen Mechanismus bestätigen. Wie im Abschnitt III.8. gezeigt wird, können auch lineare Diagramme falsche Ergebnisse liefern. Es ist aus diesem Grunde immer gut, zusätzliche, signifikante Kriterien bei der Analyse von Diagrammen zu haben. Im Fall der Gl.(55) müssen die Geraden durch den Nullpunkt des Koordinatensystems gehen. Ein solcher Punkt ist also ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit des postulierten Mechanismus. Im Fall der Gl.(29) müssen z.B. die Geraden bei verschiedenen Wellenlängen parallel zueinander verschoben sein (s.Abschnitt III. 2.1.).

Die Auswertung nach Gl.(55) wurde wieder auf die Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin angewendet. Im ersten Fall hatten beide Reaktionspartner gleiche Anfangskonzentrationen ($9 \cdot 10^{-5}$M), im zweiten Fall war die des n-Butylamins ($2 \cdot 10^{-4}$M) doppelt so gross wie die des Boc-gly-ONP's.

Abb.9 zeigt das Diagramm der Gl.(55) im Fall gleicher Ausgangskonzentrationen. - Tab.6 zeigt die errechneten Geschwindigkeitskonstanten und die eingesetzten E_{01} und $E_{\infty 1}$ - Werte. Für E_{01} wurden die Werte, die über das "SYNCHRØ"-PRØGRAMM (s.Abschnitt V.) ermittelt wurden, eingesetzt.

Tabelle 6 : Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin nach Gl.(55) errechnet.Für $E_{\infty 1}$ s.Tab.2

Wellenlänge nm	Geschwindigkeitskonstante k ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$)	$E_{\infty 1}$	E_{01}
320	2,802	0,801	0,076
310	2,788	0,943	0,150
270	2,871	0,330	0,890
265	2,817	0,251	0,868
260	2,827	0,191	0,795
230	2,707	0,627	0,245

Aus Vergleichsgründen ist k wieder auf die 3.Dezimalstelle angegeben. - Die Werte k stimmen gut mit denen aus Tab.1 , 3 und 5 überein.

In Tab.7 sind die Geschwindigkeitskonstanten für den zweiten Fall zusammengestellt.

Tabelle 7 : Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen Boc-gly-ONP (10^{-4}M) mit n-Butylamin ($2 \cdot 10^{-4}$M) nach Gl.(55) bestimmt. Die hier verwendeten $E_{\infty 1}$-und $\tilde{E}_{\infty 1}$-Werte sind die gleichen wie in Tab.5

Wellenlänge nm	Geschwindigkeitskonstante k ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$)	E_{01}
320	3,080	0,123
310	2,876	0,224
270	2,988	1,020

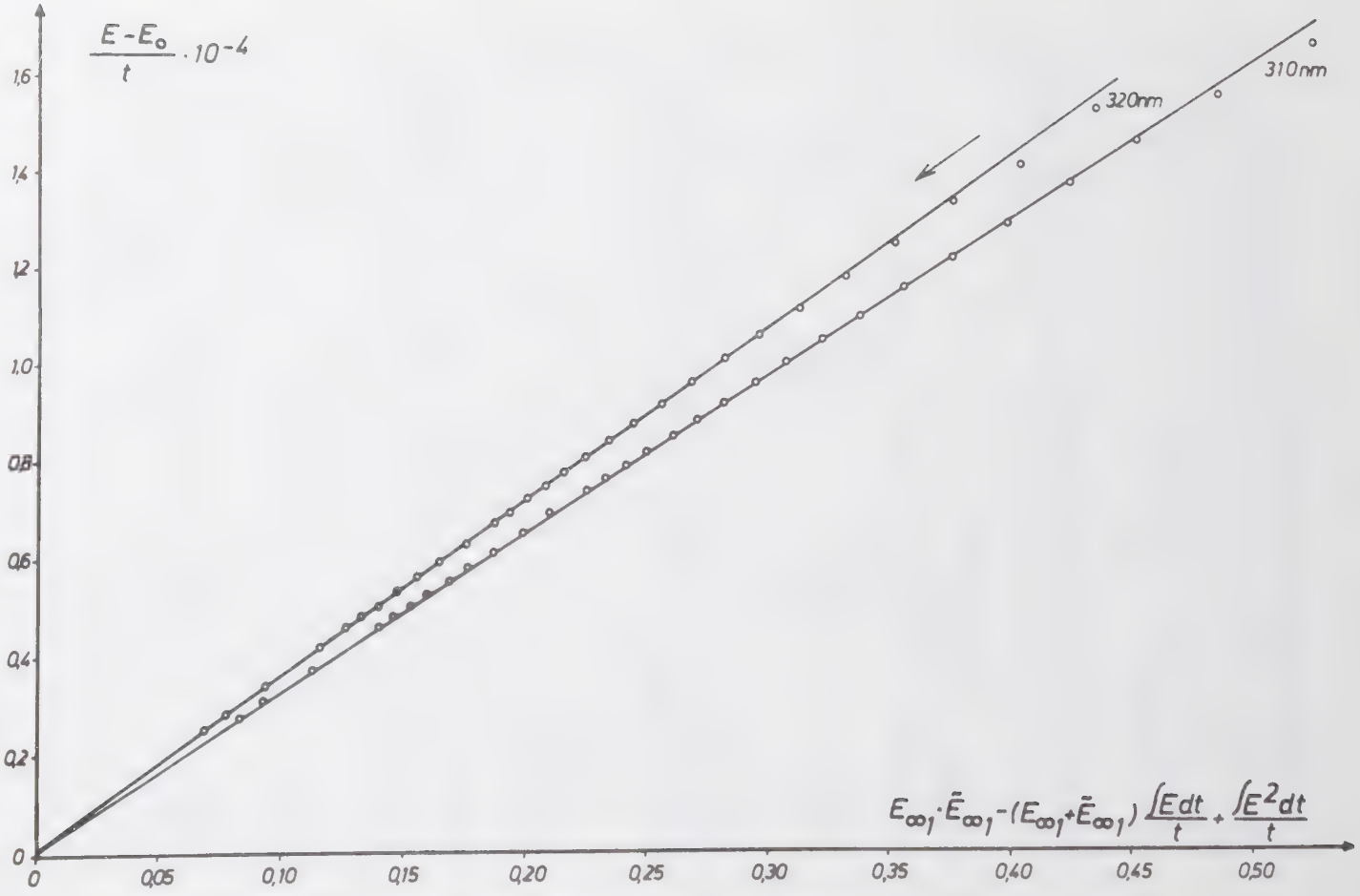


Abb. 9: Reaktion: Boc-gly-ONP + n-Butylamin. Reaktionsbedingungen wie bei Abb.2

Bei dieser Messung fallen die k - Werte etwas zu hoch an. Möglicherweise machen sich kleine Fehler in $\tilde{E}_{\infty i}$ bei der Methode der Formalen Integration der Gl.(55) stärker bemerkbar. - Die Geraden laufen auch hier durch den Koordinatenursprung.

Die Berechnung der Gl.(55) erfolgte mit dem "FØRMALIN"-PRØGRAMM (s.Abschnitt V.), das auf diese Gleichung angepasst wurde.

8. Extinktions-Differenzengleichungen

Anstelle von Differentialgleichungen können auch sog."Differenzengleichungen entwickelt werden. Der Unterschied zwischen beiden liegt darin, dass bei der Differenzenbildung nicht in unendlich kleinen Schritten wie bei der Differentialbildung vorgegangen wird, sondern die Differenz möglichst gross sein soll. Für die Ableitung einer Funktion f(x) nach der Grösse x gilt definitionsgemäss :

$$f'(x) = \lim_{\Delta x \to 0} \frac{\Delta f(x)}{\Delta x} = \lim_{\Delta x \to 0} \frac{f(x+\Delta x) - f(x)}{\Delta x} \qquad (56)$$

Indem Δx nicht mehr unendlich klein, sondern endlich gewählt wird, geht Gl.(56) bei der Differenzenbildung über in :

$$\Delta f(x) = f(x + \Delta x) - f(x) \qquad (57)$$

In der Kinetik lassen sich entsprechende "Extinktions- und Konzentrations-Differenzengleichungen" aufstellen, die hier entwickelt werden sollen.

Nach Gl.(33) gilt für die Extinktion [+)] zur Zeit t :

$$\frac{1}{E_{\infty 1} - E_1(t)} - \frac{k}{q_1} t = \frac{1}{E_{\infty 1} - E_{01}} \qquad (58)$$

Zum Zeitpunkt $(t + \Delta t)$ wird die Extinktion $E(t + \Delta t)$ gemessen.Es gilt also analog zu Gl.(58):

$$\frac{1}{E_{\infty 1} - E_1(t + \Delta t)} - \frac{k}{q_1} (t + \Delta t) = \frac{1}{E_{\infty 1} - E_{01}} \qquad (58b)$$

[+)] Bei den Extinktions- und Konzentrations-Differenzengleichungen muss die Zeit als Index angegeben werden, auf die sich die Extinktionen und Konzentrationen beziehen. I.Ggs.zu Abschnitt I. steht der Zeitindex auf der Höhe von E (bzw.a).

Werden Gl.(58) und (58b)gleichgesetzt und umgestellt, so folgt mit Gl.(57):

$$\Delta E_1(t) = E_1(t + \Delta t) - E_1(t)$$

$$= (E_{\infty 1}-E_1(t)) (E_{\infty 1}-E_1(t+\Delta t)) \frac{k\, a_o \cdot \Delta t}{E_{\infty 1} - E_{01}} \qquad (58c)$$

Da in den bisherigen Veröffentlichungen $\Delta E_1(t)$ in einem anderen Sinn als hier verwendet wurde, wird die Schreibweise $\Delta E_1(t)$ weiterhin nicht mehr benutzt [5,6,7].

In Gl.(58c)ist Δt eine konstante Grösse, die möglichst in der Grössenordnung einer Halbwertszeit liegen soll. Die Extinktionen müssen also in äquidistanten Zeiten bekannt sein. Wird die Differenz $(E_1(t+\Delta t) - E_1(t))$ gegen $(E_{\infty 1}-E_1(t)) (E_{\infty 1}-E_1(t+\Delta t))$ aufgetragen, so zeigt das Diagramm im Fall des Mechanismus A+B → C+D und $a_o = b_o$ eine Nullpunktsgerade. Aus der Steigung ist k bestimmbar.

Für den Fall $a_o \neq b_o$ kann ähnlich wie bei Gl.(58) vorgegangen werden. Setzt man wie oben die entsprechenden Grössen der Gl.(54) bei den Zeiten t und $(t + \Delta t)$ gleich, so erhält man :

$$\frac{\tilde{E}_{\infty 1} - E_1(t+\Delta t)}{E_{\infty 1} - E_1(t+\Delta t)} - \frac{\tilde{E}_{\infty 1} - E_1(t)}{E_{\infty 1} - E_1(t)}$$

$$= \frac{e^{(b_o - a_o)\, k\, t}}{\frac{a_o}{b_o}} \left(e^{(b_o - a_o)\, k \cdot \Delta t} - 1 \right) \qquad (59)$$

Berücksichtigt man nach Gl.(54), dass

$$\frac{e^{(b_o - a_o)\, k\, t}}{\frac{a_o}{b_o}} = \frac{\tilde{E}_{\infty 1} - E_1(t)}{E_{\infty 1} - E_1(t)}$$

ist, setzt diese Beziehung in Gl.(59) ein und stellt um, dann gilt :

$$E_1(t) - E_1(t + \Delta t) :=$$

$$(\tilde{E}_{\infty 1} - E_1(t))\,(E_{\infty 1} - E_1(t+\Delta t)) \left[\frac{e^{(b_o - a_o)\, k \cdot \Delta t} - 1}{E_{\infty 1} - \tilde{E}_{\infty 1}} \right] \qquad (60)$$

Trägt man $(E_1(t) - E_1(t+\Delta t))$ gegen $(\tilde{E}_{\infty 1} - E_1(t))\,(E_{\infty 1} - E_1(t+\Delta t))$ auf, so erhält man im Fall der Reaktion A+B → C+D eine Gerade durch den Koordinatenursprung, aus der die gesuchte Grösse k bestimmt werden kann. (Δt ist hier auch konstant.)

Wertet man die Reaktion Boc-gly-ONP (10^{-4}M) mit n-Butylamin ($2 \cdot 10^{-4}$M) nach Gl.(60) aus, so kann Abb.10 konstruiert werden.
Obwohl in diesem Diagramm die gleichen Messdaten wie in Abb.8 verarbeitet wurden und in beiden Diagrammen die Grössen $E_{\infty 1}$ und $\tilde{E}_{\infty 1}$ benutzt wurden, zeigt Abb.10 grössere Streuung um die Ausgleichsgerade als Abb.8.

In Tab.8 sind die nach Gl.(60) gefundenen Geschwindigkeitskonstanten mit den eingesetzten Grössen $\tilde{E}_{\infty 1}$ und E_{01} wiedergegeben. Δt betrug hier 1140 Sekunden (ungefähr 1 Halbwertszeit).

Tabelle 8 : Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion Boc-gly-ONP (10^{-4}M) mit n-Butylamin ($2 \cdot 10^{-4}$M). Für $E_{\infty 1}$ wurden die Werte der Tab.5 eingesetzt.

Wellenlänge nm	Geschwindigkeitskonstante k ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$)	$\tilde{E}_{\infty 1}$ nach Gl.(51)	E_{01}
320	2,870	1,855	0,078
310	2,855	2,101	0,168
270	2,768	-0,291	0,996

Aus Vergleichsgründen wurde auch hier k auf die 3.Dezimalstelle angegeben. -
Die Beträge von k stimmen mit denen von Tab.1, 3, 5 und 6 überein.

Werden für $E_{\infty 1}$ bzw. $\tilde{E}_{\infty 1}$ in Tab.8 bei den Wellenlängen 320, 310 und 270 nm die Werte 1,070 ; 1,155 und 0,346 bzw. 1,248 ; 1,754 und - 0,180 eingesetzt, so ist das gebildete Diagramm der Gl.(60)

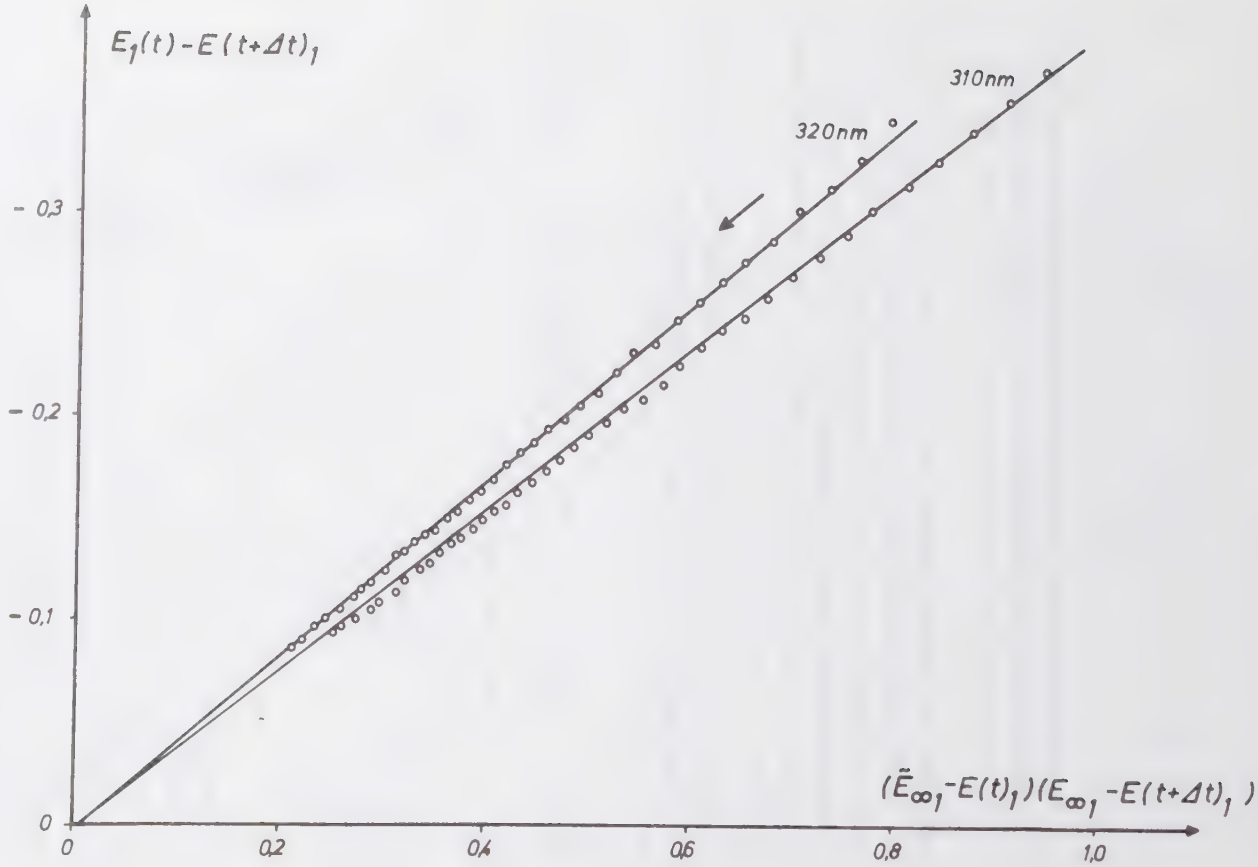


Abb.10: Extinktions-Differenzendiagramm der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin. Reaktionsbedingungen wie bei Abb.8.

ebenfalls linear (Δt = 1140 Sekunden). Dabei läuft die Gerade auch durch den Ursprung. Die Werte für k betragen 0,819 ; 2,146 und 2,467 ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$). Offensichtlich genügt die Linearität der Kurven und die Bedingung, dass die Geraden durch den Ursprung gehen müssen, nicht, um den angenommenen Mechanismus zu bestätigen ! Vielmehr müssen die Diagramme für verschiedene Wellenlängenkombinationen kontruiert und die ermittelten k - Werte verglichen werden. Erst wenn diese innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmen, sind die Diagramme aussagekräftig. - Dieses Verhalten besitzt eine gewisse Analogie zu den E- Diagrammen: die Linearität eines E - Diagrammes einer einzigen Wellenlängenkombination beweist nicht, dass das System "spektroskopisch einheitlich" (s.Abschnitt II.) ist, sondern erst wenn alle E - Diagramme der verschiedensten, über das ganze Reaktionsspektrum verteilten Wellenlängenkombinationen beweisen dies.

Es kann festgestellt werden, dass der Kurvenverlauf des Diagrammes der Gl.(60) bei falschen $E_{\infty 1}$ und $\tilde{E}_{\infty 1}$ - Werten sich nur hinsichtlich der Geradensteigung (und damit in k) signifikant bemerkbar macht.

Die Auswertung der Messdaten bei dieser Methode wurde mit den "EXTDIFGL"-PRØGRAMM durchgeführt, das die gesuchten k - Werte mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt.

Es soll hier darauf hingewiesen werden, dass Guggenheim [14] bei Reaktionen pseudo I.Ordnung die Extinktions-Differenzen-Methode schon angewendet hat. In solchen Fällen gilt die Gleichung :

$$\ln (E_1(t + \Delta t) - E_1(t)) = - k\, t + \ln \; (E_{01} - E_{\infty 1}) \; (e^{- k \cdot \Delta t} - 1) \qquad (61)$$

Diese Gleichung ist auch in Lit.15) abgeleitet.

Trägt man $\ln (E_1(t + \Delta t) - E_1(t))$ gegen t auf, so ist k für Reaktionen pseudo 1.Ordnung nach Gl.(61) leicht bestimmbar.

Anstelle von Gl.(61) kann auch folgende Beziehung abgeleitet werden (Swinbourne [16]):

$$E_1(t+\Delta t) - E_1(t) =$$

$$E_1(t)\,(e^{-k\cdot\Delta t} - 1) + E_{\infty 1}\,(1 - e^{-k\cdot\Delta t}) \qquad (62)$$

In diesem Fall würde man nicht den Logarithmus von $(E_1(t+\Delta t)-E_1(t))$ gegen t auftragen, sondern die Extinktionsdifferenz gegen $E_1(t)$. Möglicherweise ist dieses Diagramm signifikanter.

9. Konzentrations-Differenzengleichungen

Anstelle von Extinktions-Differenzengleichungen können auch Konzentrations-Differenzengleichungen für Reaktionen vom Mechanismus $A+B \rightarrow C+D$ aufgestellt werden.

Im Fall $a_o \neq b_o$ gilt nach Gl.(38b) mit der Beziehung [+)]

$$b_o - b = a_o - a$$

$$a(t) = \frac{(b_o - a_o)\,\frac{a_o}{b_o}\,e^{-(b_o - a_o)\,k\,t}}{1 - \frac{a_o}{b_o}\,e^{-(b_o - a_o)\,k\,t}}$$

Wird $u = b_o/a_o$ gesetzt, so folgt aus der obigen Gleichung :

$$a(t) = \frac{a_o\,(u-1)\,e^{-(u-1)\,a_o\,k\,t}}{u - e^{-(u-1)\,a_o\,k\,t}}$$

Verfährt man mit dieser Gleichung wie im Abschnitt III.8., so erhält man die Gleichung :

$$\frac{a(t+\Delta t) - a(t)}{a(t)} = -(1-e^{-\tau}) - \left(\frac{1 - e^{-\tau}}{b_o - a_o}\right) a(t+\Delta t) \qquad (63)$$

mit $\tau = (b_o - a_o)\,k\cdot\Delta t$

[+)] s. Fussnote Abschnitt III.8.

Gl.(63) gilt wie Gl.(43) auch für den Fall $a_o = b_o$, allerdings kann sie dann einfacher geschrieben werden. Strebt $a_o \rightarrow b_o$, so strebt τ gegen null, d.h. $\lim_{\tau \to o} e^{-\tau} = 1$. Das 2.Glied der Gl.(63) enthält dann den Ausdruck 0/0. Entwickelt man $e^{-\tau}$ hier nach einer Reihe und bricht nach dem 2. Glied ab, so geht Gl.(63) über in:

$$\frac{a(t + \Delta t) - a(t)}{a(t)} = - k \cdot \Delta t \; a(t + \Delta t) \qquad (64)$$

Gl.(64) kann auch direkt über die Konzentrationsgleichungen der Reaktion $2A \rightarrow B$ bewiesen werden.

Die Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin (beide $9 \cdot 10^{-5}$M) wurde auch nach Gl.(64) ausgewertet. Die Konzentrationen wurden über das "FØRMALIN"-PRØGRAMM (s.Abschnitt V.1.) ermittelt und die über die Gewichte optimal bestimmten Konzentrationen eingesetzt. Abb.11 zeigt das Ergebnis. Für die Differenz $(a(t + \Delta t) - a(t))$ wurde dabei Δa gesetzt. Für die Geschwindigkeitskonstante k wurde der Wert 2,78 ($Mol^{-1} sec^{-1}$) ermittelt, der in guter Uebereinstimmung mit den wahrscheinlichsten Werten der Tabellen 1, 3, 5, 6 und 8 steht.

Der Vorteil der Konzentrations-Differenzengleichungen gegenüber den Extinktions-Differenzengleichungen im Fall $a_o \neq b_o$ liegt darin, dass bei der Bestimmung der Konzentrationen nicht $\tilde{E}_{\infty 1}$, sondern nur $E_{\infty 1}$ bekannt sein muss. Kann aber für $\tilde{E}_{\infty 1}$ Gl.(53) eingesetzt werden, kann i.a. $\tilde{E}_{\infty 1}$, wie gezeigt wurde, genau bestimmt werden.

Der Nachteil der Methode der Differenzengleichungen liegt darin, dass die Extinktionen bzw. Konzentrationen in äquidistanten Zeitabschnitten bekannt sein müssen, da Δt = const sein muss. Dieses Problem kann aber mit Hilfe von Grossrechenanlagen gelöst werden, wenn die Messungen nicht unter diesen Bedingungen durchgeführt wurden. Durch die Kurven können Parabeln 2.Grades gelegt und die zu gleichen Zeitdifferenzen zugehörigen Konzentrationen berechnet werden.

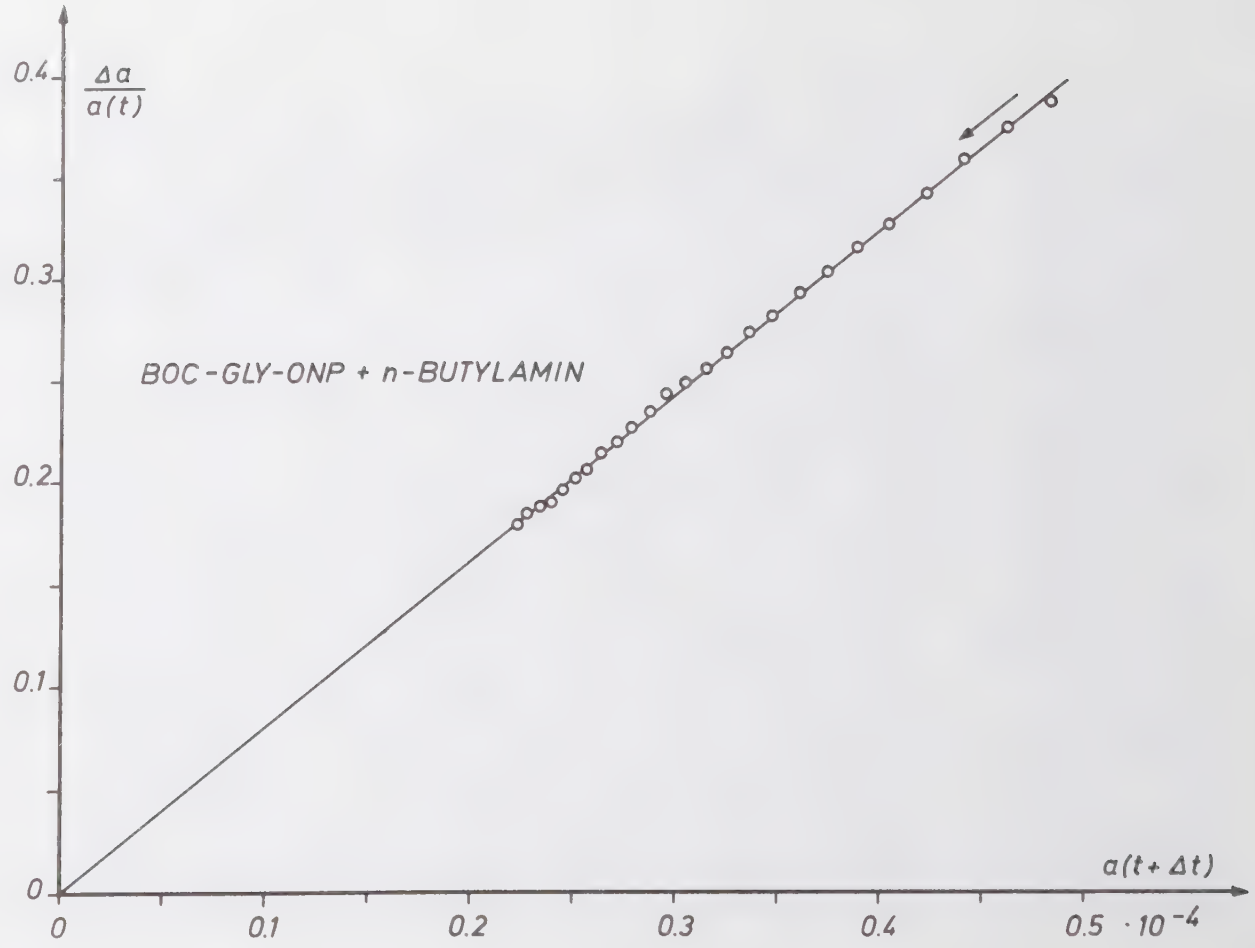


Abb. 1: Reaktion: Boc-gly-ONP + n-Butylamin – Reaktionsablauf wie bei Abb. 2

10. Vergleich der verschiedenen Methoden der Auswertung von Reaktionen 2.Ordnung

Die in den bisherigen Abschnitten abgeleiteten Gleichungen sind entstanden, indem die entsprechenden Differentialgleichungen (sowohl die der Extinktionen als auch der Konzentrationen) mit 3 verschiedenen mathematischen Methoden gelöst wurden :

1. Lösung der Differentialgleichung mittels geschlossener Integration
2. Lösung der Differentialgleichung mit Hilfe der Formalen Integration
3. Uberführung der Differentialgleichung in die Differenzengleichung

Alle Methoden liefern übereinstimmende Geschwindigkeitskonstanten. Einige haben den Vorteil, dass bei der Reaktion A+B → C+D die Fälle $a_o = b_o$ und $a_o \neq b_o$ nicht unterschieden werden müssen (Gl.(43), (47), (47b), (63)). - Werden Diagramme konstruiert, in denen $\bar{E}_{\infty 1}$ auftreten, son sind diese i.a. nur anwendbar, wenn Gl.(53) gilt.

Die Auswertung nach den Gleichungen (29),(33),(54),(58c)und (60) haben den Vorteil, dass die entsprechenden Diagramme leicht und schnell konstruierbar sind. Bei der Verwendung der Diagramme der Gl.(43) und (55) ist der Einsatz einer Grossrechenanlage naheliegend. - Sind die Konzentrationen bekannt, so ist die Auswertung der Gleichungen (38b), (39b) und (63) ebenfalls leicht durchführbar. Werden die Konzentrationen über Gl.(32) oder Gl.(36) bzw.(37) bestimmt, muss $E_{\infty 1}$ bekannt sein. $E_{\infty 1}$ ist im Fall $a_o = b_o$ über Gl.(29) oder (47) bzw.(49) erhältlich, ohne dass die Reaktion bis zum vollständigen Reaktionsumsatz verfolgt werden muss. Im Fall $a_o \neq b_o$ ist $E_{\infty 1}$ oft auch experimentell zugängig.

Die verschiedenen abgeleiteten Auswertungsmethoden sind in Tab.9 zusammengestellt. Aus Analogiegründen sind die entsprechenden Gleichungen für Reaktionen pseudo 1.Ordnung angegeben werden.

In Tab.10 sind die nach den verschiedenen Verfahren bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion Boc-gly-ONP mit n-Butylamin zur Uebersicht und zum Vergleich zusammengestellt.

Die im Abschnitt III. abgeleiteten Verfahren sind z.T. publiziert[17].

Tabelle 9 : Übersicht der abgeleiteten Methoden zur Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten 2.Ordnung. Vollständigkeitshalber sind die entsprechenden Gleichungen pseudo 1.Ordnung angegeben.

1. O R D N U N G A ⟶ B	2. O R D N U N G A + B ⟶ C + D $a_o = b_o$	 $a_o \neq b_o$
$\ln \left(\frac{E_{\infty 1} - E_1}{E_{\infty 1} - E_{01}}\right) = -k\,t$ Lit.11)	$\frac{E_1 - E_{01}}{t - t'} = k\,a\,E_{\infty 1} - k\,a\,E_1$ Gl.(29) bzw. Gl.(33)	$\ln \left(\frac{\tilde{E}_{\infty 1} - E_1}{E_{\infty 1} - E_1}\right) = \ln \frac{b_o}{a_o} + (b_o - a_o)\,k\,t$ Gl.(54)
$\frac{E_1 - E_{01}}{t} = kE_{\infty 1} - k\,\frac{\int_{t=o}^{t} E_1 dt}{t}$ Lit.11)	$\frac{E_1 - E_{01}}{t} = \frac{k}{q_1}\,(E_{\infty 1}\tilde{E}_{\infty 1} - (E_{\infty 1} + \tilde{E}_{\infty 1})\,\frac{\int_{t=o}^{t} E_1 dt}{t} + \frac{\int_{t=o}^{t} E_1^2\,dt}{t}$ mit $q_1 = \frac{E_{\infty 1} - E_{01}}{a_o}$ Gl.(55)	im Fall $a_o = b_o$: $\tilde{E}_{\infty 1} = E_{\infty 1}$
$a - a_o = -k \int_{t=o}^{t} a\,dt$ oder $\ln \frac{a}{a_o} = -k\,t$	$\frac{\ln \frac{a}{a_o}}{t} = k\,(a_o - b_o) - k\,\frac{\int_{t=o}^{t} a\,dt}{t}$ Gl.(43)	
$a(t+\Delta t) - a(t) = -(1 - e^{-k\,\Delta t})\,a(t)$	$\frac{a(t+\Delta t) - a(t)}{a(t)} = -k\,\Delta t\;a(t+\Delta t)$ Gl.(64)	$\frac{a(t+\Delta t) - a(t)}{a(t)} = -(1 - e^{-\tau}) - (\frac{1 - e^{-\tau}}{b_o - a_o})\;a(t+\Delta t)$ mit $\tau = (b_o - a_o)\,k\,t$ Gl.(63)
$E_1(t+\Delta t) - E_1(t) =$ $(e^{-k\,\Delta t} - 1)\,E_1(t) +$ $E_{\infty 1}(1 - e^{-k\,\Delta t})$ Gl.(62)	$E_1(t+\Delta t) - E_1(t) =$ $(E_{\infty 1} - E_1(t))(E_{\infty 1} - E_1(t+\Delta t))\,\frac{k a_o \Delta t}{E_{\infty 1} - E_{01}}$ Gl.(58c)	$E_1(t+\Delta t) - E_1(t) =$ $-(\tilde{E}_{\infty 1} - E_1(t))(E_{\infty 1} - E_1(t+\Delta t))\;\frac{e^{(b_o - a_o)k\Delta t} - 1}{E_{\infty 1} - \tilde{E}_{\infty 1}}$ Gl.(60)

Tabelle 10 : Vergleich der nach den verschiedenen Methoden ermittelten k-Werte bei der Reaktion Boc-gly-ONP (Stoff A) mit n-Butylamin in Acetonitril. Wenn nicht angegeben, sind die Ausgangskonzentrationen der Reaktionspartner gleich ($a_o = 9 \cdot 10^{-5}$ M). In den anderen Fällen ist $a_o = 10^{-4}$ M .
Reaktionstemperatur : 25,0 ± 0,2 °C

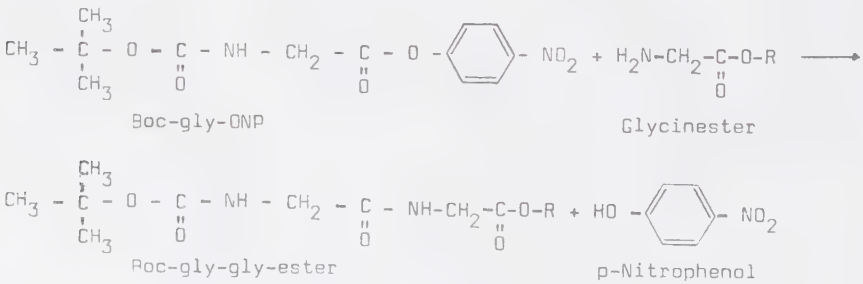
	Geschwindigkeitskonstante k ($Mol^{-1} \cdot sec^{-1}$)						
Wellenlänge nm	nach Gl.(29)	nach Gl.(33)	nach Gl.(43)	nach Gl.(54) $2a_o = b_o$	nach Gl.(55)	nach Gl.(55) $2a_o = b_o$	nach Gl.(60) $2a_o = b_o$
320	2,80	3,01	2,79	2,71	2,80	3,08	2,87
310	2,78	2,99	Referenz	2,68	2,79	2,88	2,86
270	2,87	3,15	2,81	2,76	2,87	2,99	2,77
265	2,85	3,13	2,79	-	2,82	-	-
260	2,83	3,19	2,79	-	2,83	-	-
230	2,86	3,02	2,78	-	2,71	-	-

IV. Die Reaktion von Boc-glycin-p-nitrophenolester mit Glycinester-Verbindungen in Acetonitril [18]

1. 'Klassische' Peptidsynthese

In der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Bayer sind neue Darstellungen der Peptidsynthese entwickelt worden. Diese Reaktionen sollen hier kinetisch näher untersucht werden. Um dabei einen Vergleich mit den bisherigen Synthesemethoden ziehen zu können, wurden die Reaktionen der "klassischen Peptidsynthese" herangezogen. "Klassisch" bedeutet hier, dass durch Reaktion von aktivierten Estern (sog."Esterkomponenten" wie Boc-gly-ONP, Anhydride etc.,deren Aminogruppen gegen Acylierungsreaktionen geschützt sind) mit "freien Aminogruppen" (sog."Aminkomponenten") Peptide dargestellt werden. Kinetische Untersuchungen solcher Reaktionen sind in der Literatur [19,20] zahlreich beschrieben. Die Autoren benutzen dabei für die kinetische Analyse bevorzugt Gl.(38b) bzw.(39b). I.Ggs. hierzu sollen die Reaktionen der Peptidsynthese nach den Gl.(29) und (43) ausgewertet werden, die sich als besonders geeignet erwiesen haben (s.Abschnitt III.).

Bei allen hier untersuchten Reaktionen ist als Esterkomponente Boc-gly-ONP verwendet worden. Aus Gründen der Stabilität werden i.a. die Aminkomponenten als Hydrochloride vorgelegt. Da aber das unprotonisierte Amin bevorzugt in Reaktion tritt, wird das Proton hier mit Triäthylamin (TAA) abgefangen. Es werden auch andere, bessere Protonenfänger [19], die weniger als TAA Racemisierung hervorrufen, eingesetzt. Da aber hier das Ausmass der Racemisierung nur von geringerem Interesse ist, und die Aminkomponente möglichst total deprotonisiert werden soll, wurde der starke Protonenacceptor TAA gewählt. Dieses ist nicht ganz unproblematisch, wie sich zeigen sollte.
Die untersuchten Reaktionen sind vom Typ A+B → C+D :



Als Glycinester sind zunächst tert.Butyl-glycin-ester, Glycin-äthyl-ester und Triglycin-äthylester gewählt worden.

Für die Auswertung der im Abschnitt IV. untersuchten Reaktionen sind die Gl.(29) und (43) herangezogen worden. - In Abb.12 ist das Diagramm der Gl.(29) und in Abb. 13 das der Gl.(43) der Reaktion Boc-gly-ONP mit tert.Butyl-glycin-ester·HCl (+TAA)wiedergegeben. Abb.12 zeigt die in Abschnitt III.2.1. geforderten Bedingungen: Linearität und Parallelität der konstruierten Kurven. In Abb.13 ist die Streuung der Messpunkte zu Reaktionsbeginn grösser als in Abb.12. Offensichtlich machen sich hier Fehler stärker bemerkbar. - Die Gerade in Abb.13 geht wie gefordert durch den Koordinatenursprung, da die Reaktionspartner gleiche Ausgangskonzentrationen hatten.

Die E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramme bei den Reaktionen mit den Aminkomponenten tert.Butyl-glycinester (ohne HCl), Glycin-äthylester·HCl (TAA - Konzentration = $1{,}25 \cdot 10^{-3}$M) und Triglycin-äthylester·HCl zeigen ähnliches Verhalten: am Anfang der Reaktion Streuung und z.T. systematische Abweichung vom linearen Verlauf. In Abb.14 sind die E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Kurven bei der konstanten Wellenlänge 320nm aller gemessenen Reaktionen in einem Schaubild zusammengestellt. Dabei musste aus technischen Gründen der Ursprung des Koordinatensystems verschoben werden. Die Koordinaten des jeweiligen "wahren" Ursprungs sind in der Legende zu Abb.14 angegeben.

Die Abweichungen vom linearen Verlauf bei den Diagrammen der Gl.(43) sind z.T. ausgeprägter als bei denen der Gl.(29). Wie auch in Abb.13 zu sehen ist, münden zu Reaktionsbeginn die Kurven meistens oberhalb in die Ausgleichsgerade ein. Da dies mehr oder weniger stark bei fast allen untersuchten Wellenlängen auftritt, muss angenommen werden, dass hier reine Messfehler nicht alleine in Betracht kommen können (vgl. Abb.6), sondern weitere Effekte und Reaktionen diskutiert werden müssen. Die grössere Steigung der Kurve in Abb.13 und die kleinere Steigung der Kurve in Abb.14 zu Reaktionsbeginn sprechen dafür, dass am Anfang die Reaktion zu schnell abläuft. Die mögliche Ursache hierfür wird unten diskutiert (Abschnitt IV.6.).

Die E - Diagramme der untersuchten Reaktionen können z.gr.T. (ausser der Reaktion mit Glycin-äthylester · HCl im Fall b) - s.Abschnitt IV.2.) als

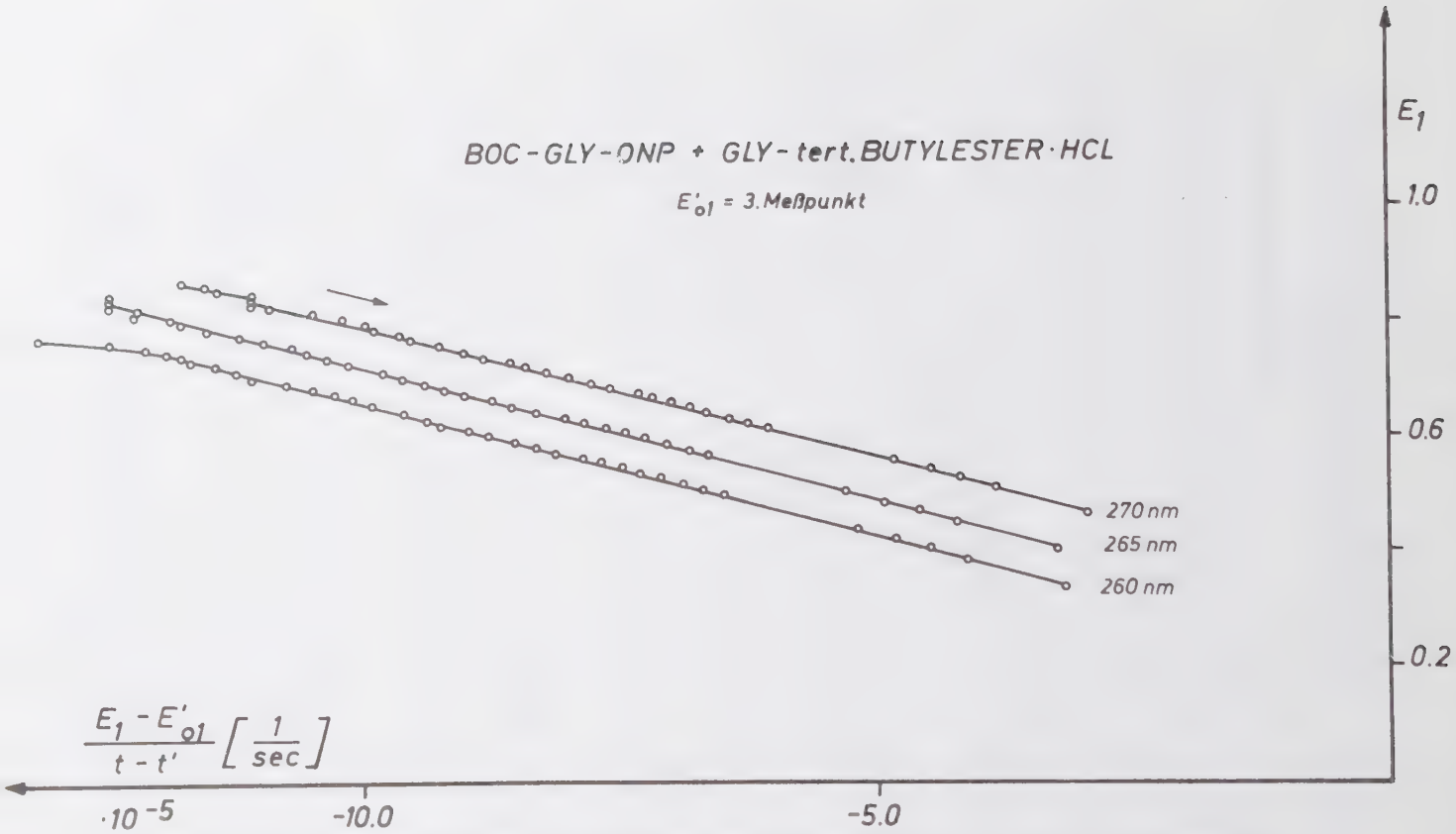


Abb.12: Das Diagramm der Gl.(29) der Reaktion Boc-gly-ONP mit Gly-tert.butylester·HCl und TAA (überall gleiche Ausgangskonzentration: $9 \cdot 10^{-4}$M). Acetonitril: 25,0±0,2°C

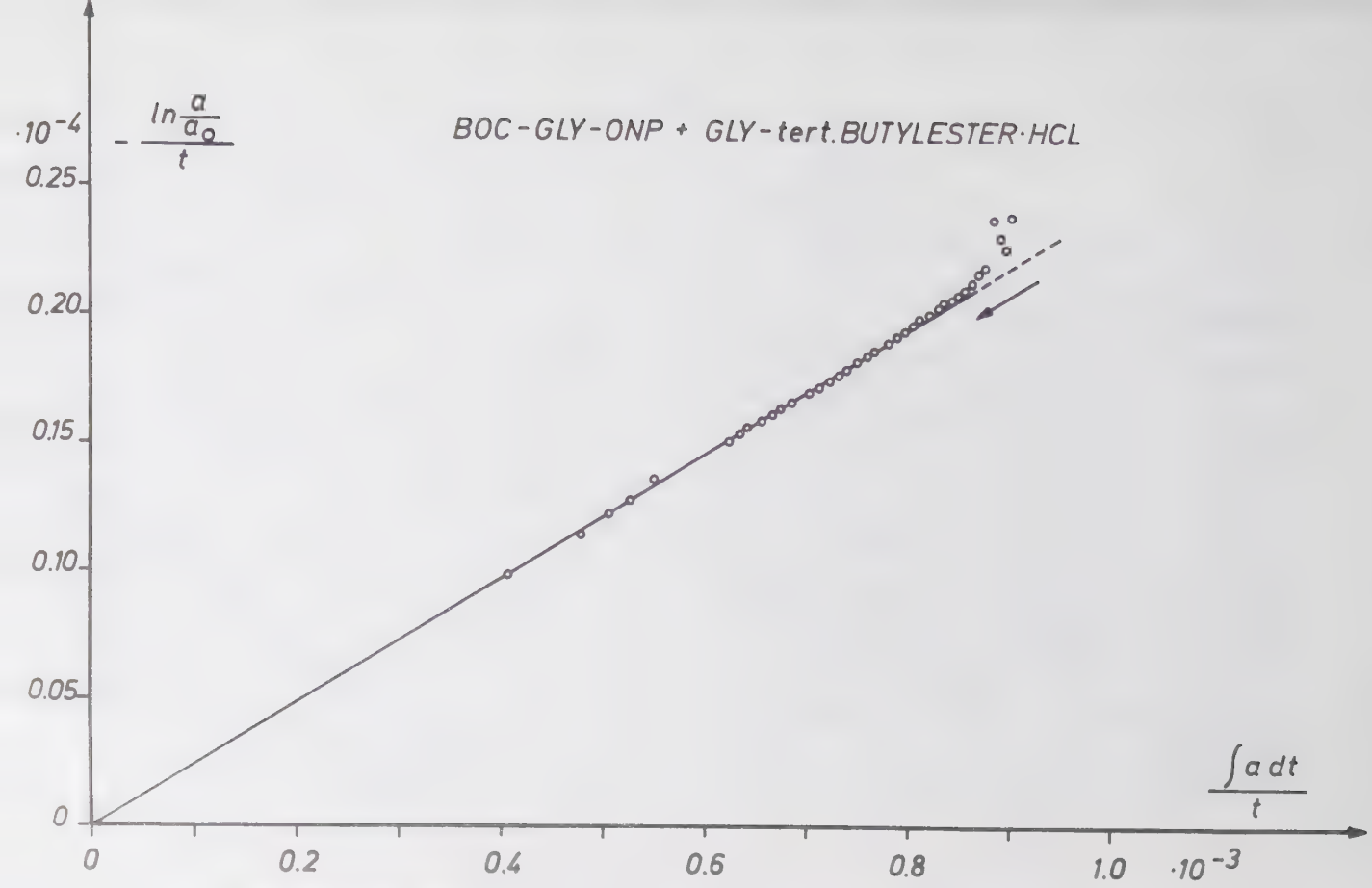


Abb.13: Das Diagramm der Gl.(43) der Reaktion Boc-gly-ONP mit Gly-tert.butylester·HCl und TAA (Reaktionsbedingungen wie in Abb.12).

Legende zu Abb.14 :

E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramm aller gemessenen Peptid-synthese-Reaktionen. Wellenlänge = 320 nm. Der Ursprung dieses Diagrammes ist für die einzelnen Reaktionen verschoben. Der "wahre" Ursprung liegt jeweils bei den $(E_{320} - E'_{0\ 320})/(t - t')$ - bzw. E_{320} - Werten :

(a) $(Gly)_3$-äthylester·HCl: - 0,1; + 0,9
(b) PAG(4 000)-gly·HCl: - 0,1; + 0,8
(c) tert.Butyl-glyester·HCl: - 0,35; + 0,7
(d) tert.Butyl-glyester ohne HCl: - 0,3; + 0,6
(e) PAG(20 000)-$(gly)_3$·HCl: - 0,15; + 0,5
(f) PAG(2 000)-gly·HCl: 0; + 0,2
(g) PAG(10 000)-gly·HCl: 0; + 0,2
(h) PAG(6 000)-gly·HCl: - 0,1; + 0,2
(i) Gly-äthylester·HCl (TAA = $5 \cdot 10^{-3}$M): - 0,25; + 0,1
(k) Gly-äthylester·HCl (TAA = $1{,}25 \cdot 10^{-3}$M): - 0,2; 0
(l) PAG(20 000)-gly·HCl: - 0,2; - 0,05
(m) Gly-2-methoxy-äthylester·HCl: - 0,35; 0

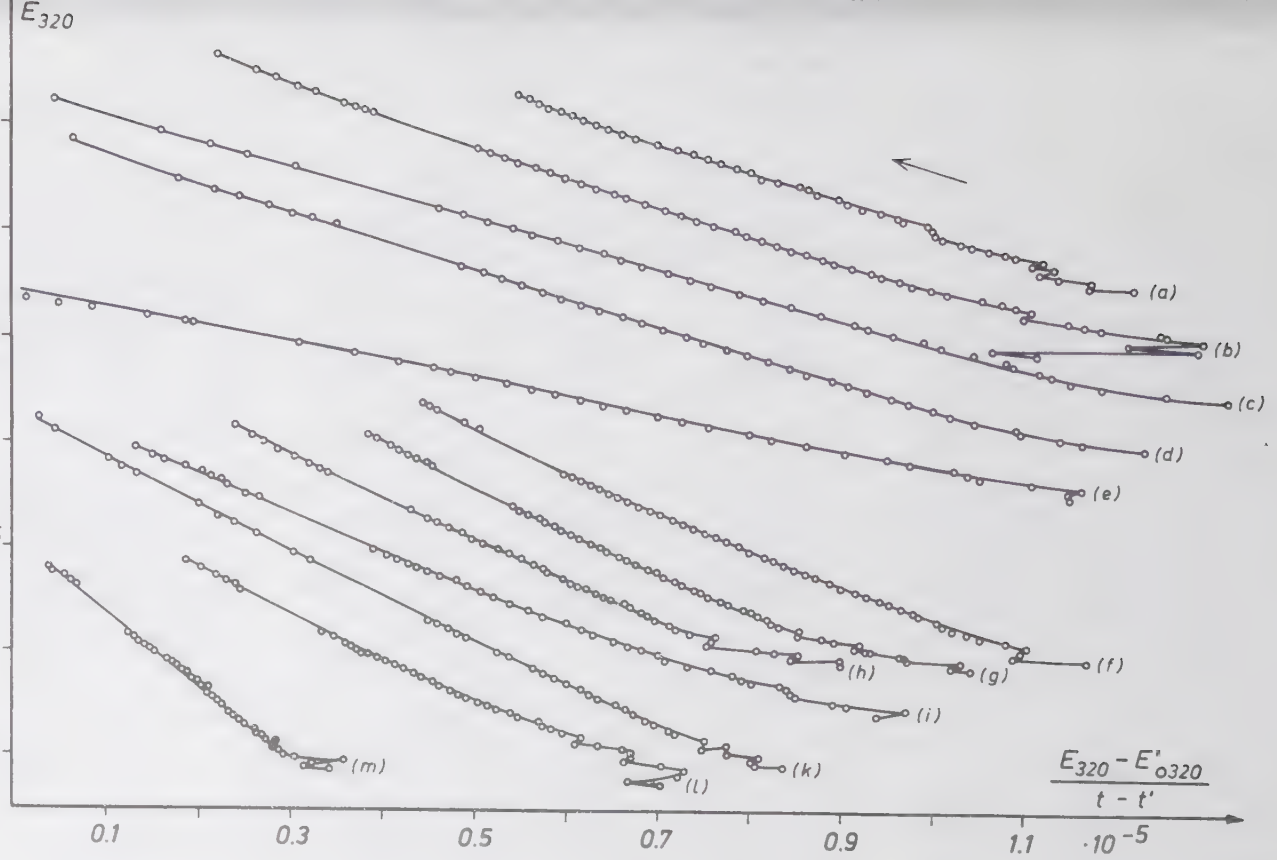

E_{320}
1.3
0.9
0.5
0.1
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(k)
(l)
(m)
$\frac{E_{320} - E'_{o320}}{t - t'}$
0.1
0.3
0.5
0.7
0.9
1.1
$\cdot 10^{-5}$

Abb. 11

linear betrachtet werden. Lediglich ab ca. 60-70 % Umsatz zeigen manche Kurven geringe Abweichung von der Geraden. Dieses Verhalten steht scheinbar i.Ggs. zu den obigen Feststellungen im Anfangsbereich der konstruierten Kurven. Lineare E - Diagramme bedeuten nur, dass das System "spektroskopisch einheitlich" ist, nicht aber, dass das System auch "einheitlich" (s.Abschnitt II.) sein muss. Nebenreaktionen, die sich spektroskopisch nicht bemerkbar machen, verändern den Habitus der E - Diagramme nicht wohl aber den der $E_1,(E_1-E'_{01})/(t-t')$-Diagramme (diese Diagramme gelten nur für die Reaktion A+B → C+D, wobei die Stoffbilanz der Stoffe A, B, C und D nur von dieser Reaktion bestimmt wird) . Aus diesem Grunde sind die Diagramme der Gl.(29) (ebenso Gl.(43)) als sehr spezifisch für Reaktionen 2.Ordnung anzusehen.

Um den Einfluss des Protonenfängers TAA auf die Reaktion studieren zu können, wurde zu der Aminkomponente Glycin-äthylester·HCl (Konzentration = 10^{-3}M, s.Tab.11) im Fall a) 25%-igen TAA-Ueberschuss und im Fall b) 500%-igen TAA-Ueberschuss (s.Tab.11) vorgelegt. Die Kurven der Gl.(29) sind im Fall b) kontinuierlich gekrümmt und im Fall a) ist i.Vgl. zu den anderen Reaktionen dieses Abschnittes keine besondere Anomalie festzustellen (s.auch Abb.14 (i),(k)). Aus diesem Grunde kann die Reaktion des Falles b) nach Gl.(29) und (43) nicht ausgewertet werden,und damit wird auch die Diskrepanz der k - Werte in der Tab.11 bei dieser Reaktion erklärlich. Die besondere Empfindlichkeit der Methode der Formalen Integration (Gl.(43)) auf Nebenreaktionen wird hier weiter demonstriert (besonders stark streuende Anfangspunkte wurden für die Berechnung der Steigung der Ausgleichsgeraden nicht berücksichtigt). Bestimmt man k nach Gl.(29), wobei der gekrümmte Anfangsteil der Kurve ebenfalls nicht ausgewertet wurde, so ist k in beiden Fällen (a), b)) ungefähr gleich (s. Tab.11).

Der besondere Einfluss von TAA auf die Reaktion wird im Abschnitt IV.2. näher betrachtet.

Der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen mit den Aminkomponenten tert.Butyl-glycinester·HCl und Glycin-äthylester·HCl zeigt, dass der tert.Butylester ca. doppelt so schnell umgesetzt wird als der Aethylester (s.Tab.11). Dies ist überraschend. Offensichtlich macht sich der - I-Effekt beim tert.Butylester stärker bemerkbar als ungünstige sterische Eigenschaften. Da der tert.Butylester einen

Tabelle 11 : Die nach Gl.(29) ("EDTQ"-PRØGRAMM) und Gl.(43) ("FØRMALIN"-PRØGRAMM) ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Dipeptidsynthese-Reaktionen: Boc-gly-ONP + Glycinester in Acetonitril. Die eingesetzten Konzentrationen der Reaktionspartner sind überall gleich.

Reaktionstemperatur: 25,0 ± 0,2 °C

Reaktion: Boc-gly-ONP + Aminkomponente	Geschwindigkeitskonst. k (Mol^{-1} sec^{-1}) nach Gl.(29)	nach Gl.(43)	Konzentration der Aminkomponente = Konzentration an Boc-gly-ONP	Konzentration an TÄA	Reaktion bis zum Umsatz verfolgt
tert.Butyl-gly-ester·HCl	0,24 10^{-1}	0,26 10^{-1}	9 10^{-4}M	9 10^{-4}M	ca 75 %
tert.Butyl-gly-ester ohne HCl	0,23 10^{-1}	0,24 10^{-1}	9 10^{-4}M	-	ca 78 %
Gly-äthylester·HCl	0,12 10^{-1}	0,13 10^{-1}	10^{-3}M	1,25 10^{-3}M	ca 80 %
Gly-äthylester·HCl	0,14 10^{-1}	0,24 10^{-1}	10^{-3}M	5 10^{-3}M	ca 65 %
$(Gly)_3$-äthylester·HCl	0,19 10^{-1}	0,19 10^{-1}	10^{-3}M	1,05 10^{-3}M	ca 52 %
Gly-2-methoxyäthylester·HCl	0,71 10^{-2}	0,79 10^{-2}	10^{-3}M	1,05 10^{-3}M	ca 42 %
PÄG(20 000)-gly·HCl	0,12 10^{-1}	0,14 10^{-1}	10^{-3}M	1,05 10^{-3}M	ca 57 %
PÄG(10 000)-gly·HCl	0,12 10^{-1}	0,14 10^{-1}	10^{-3}M	1,05 10^{-3}M	ca 60 %
PÄG(6 000)-gly·HCl	0,13 10^{-1}	0,16 10^{-1}	10^{-3}M	1,05 10^{-3}M	ca 64 %
PÄG(4 000)-gly·HCl	0,17 10^{-1}	0,19 10^{-1}	10^{-3}M	1,05 10^{-3}M	ca 75 %
PÄG(2 000)-gly·HCl	0,16 10^{-1}	0,18 10^{-1}	10^{-3}M	1,05 10^{-3}M	ca 65 %
PÄG(20 000)-$(gly)_3$·HCl	0,32 10^{-1}	0,31 10^{-1}	10^{-3}M	1,05 10^{-3}M	ca 86 %

grösseren Amin-pK-Wert als der Aethylester in Wasser und auch in Acetonitril haben dürfte, ist der tert.Butylester auch reaktiver[21]. (Der pK-Wert in Wasser von Glycin-äthylester bzw.Glycin-methylester beträgt 7,83 bzw. 7,73 [22].)

Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion mit der Aminkomponente Triglycin-äthylester·HCl hebt sich in keiner Weise von den k - Werten der anderen Reaktionen im "klassischen System" (s.Tab.11) hervor. Dieser Befund wird erst i.Vgl. zur Reaktion mit PAG(20 000)-$(gly)_3$·HCl (s.Abschnitt IV.5.2)interessant.

2. Die Reaktion von Triäthylamin (TAA) mit Boc-gly-ONP

Wie im Abschnitt IV.1. gezeigt wurde, darf TAA im Ueberschuss zum Reaktionssystem nicht zugegeben werden, ohne die ablaufenden Prozesse zu beeinflussen. Die konstruierten Diagramme der Gl.(29) und (43) zeigen einen systematischen Gang bei der Reaktion mit der Aminkomponente Glycin-äthylester·HCl bei einem 5-fachen TAA - Ueberschuss (s.Abb.14 (i) und Tab.11). Die E - Diagramme sind schwach gekrümmt bei den Wellenlängenkombinationen in nm: 310/270 ; 310/265 ; 310/260 . Aus diesem Grunde wurde zunächst geprüft, ob TAA und Boc-gly-ONP sich in Acetonitril umsetzen. Dazu wurde TAA in 20 bzw.40-fachem Ueberschuss zu Boc-gly-ONP gegeben und die einsetzende Reaktion bei den Wellenlängen 430, 420, 320, 310, 270, 265 und 260 nm verfolgt. Die Reaktion ist langsam und nach 5 Tagen noch nicht beendet. Die E - Diagramme sind alle gekrümmt, wenn als Referenz die Wellenlänge 420 nm gewählt wird. Zu Reaktionsbeginn ist die Krümmung am stärksten. Gegen "Ende" verlaufen die E - Diagramme linear. In diesem System laufen also mindestens 2 linear unabhängige Teilreaktionen [6,7] ab.

Folgende Prozesse können hier angenommen werden:

1. die Reaktion von OH^- - Anionen mit Boc-gly-ONP, durch TAA und Wasser als Verunreinigung in Acetonitril erzeugt und
2. die direkte Umsetzung von TAA mit Boc-gly-ONP zu dem entsprechenden Trialkyl-acyl-ammoniumsalz

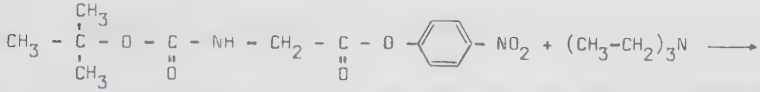
Eine Bestimmung des Wassergehaltes[+)] in Acetonitril (Fluka, Uvasol) ergab einen Wert von 0,11% ! Bei einer so hohen Wasserverunreinigung

[+)] Der Wassergehalt wurde bestimmt im Laboratorium Fresenius, Wiesbaden, Dr.Schneider

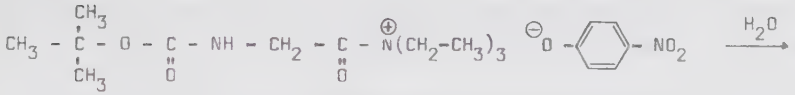
ist die Anwesenheit von OH^- in Cgw. von TAA naheliegend. Aus diesem Grunde wird in Abschnitt IV.3. dieser Einfluss genauer untersucht.

Trialkyl-acyl-ammoniumsalze (bzw.deren Derivate) werden in der Literatur[23] beschrieben. D.Cook gibt die Darstellung von Di- und Trialkyl-acyl-ammonium-halogeniden und deren spektroskopische Eigenschaften im IR - Bereich ausführlich in Literatur 24) an.

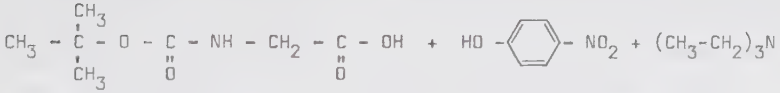
Mit der Feststellung, dass das System nicht "einheitlich" ist, könnte folgender Mechanismus postuliert werden:



Boc-gly-ONP TAA



Boc-glycinacyl-triäthyl-ammonium-p-nitrophenolat



Boc-glycin p-Nitrophenol TAA

für diesen Mechanismus spricht die langwellige Absorption, bedingt durch p-Nitrophenolat. (Präparativ hergestelltes und in Wasser zweimal umkristallisiertes Natrium-p-nitrophenolat zeigt in Acetonitril ein Absorptionsmaximum bei 417 nm.) - Ob die Trialkyl-acyl-ammonium-Verbindung allerdings in grösserer Menge auftritt, ist zu bezweifeln, da solche Verbindungen sehr leicht von Wasser zersetzt werden.[24]

Es wurde versucht, mit Hilfe der ^{13}C - Spektroskopie+) die Trialkyl-acyl-ammonium-Verbindung oder entsprechende Umlagerungsprodukte nachzuweisen. Dazu wurden 0,304 Gramm Boc-gly-ONP in 1 ml reinem TAA gelöst und mehrere Wochen stehen gelassen. Die Lösung färbte sich von gelb nach dunkelrot-braun. Das TAA wurde unter Ausfrieren in einer Kühlfalle mit Hilfe einer Oelvakuumpumpe abdestilliert und der ölige

+) Herrn Dr.Breitmeier vom Organ.-chem.Inst.der Universität Tübingen danke ich sehr für die Aufnahmen und Interpretationen der 13-C - spektren

Rückstand in deuteriertem Acetonitril (Merck) [+)] aufgenommen. Das ^{13}C-Spektrum zeigte ausser den Signalen von Acetonitril, TAA und Boc-gly-ONP 9 weitere, z.T. schwache Peaks, die aber nicht interpretiert werden konnten.

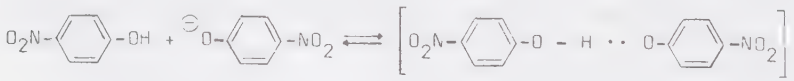
Es soll darauf hingewiesen werden, dass über Trialkyl-aminosäureacyl-ammoniumsalze, z.B. aus den entsprechenden aminogeschützten Aminosäurechloriden und TAA hergestellt, Peptide darstellbar sein dürften, wenn dem System die Aminkomponente zugegeben wird. Diese Darstellungsweise dürfte dann von Interesse sein, wenn schwer kuppelbare Aminosäuren (z.B. Boc-leu-ONP + tert.Butyl-val-ester) zu Peptiden zusammengefügt werden sollen.

Wenn Boc-glycinacyl-triäthyl-ammonium-p-nitrophenolat wegen des vorhandenen Wassers nur in kleinen Mengen gebildet werden sollte, wäre ein lineares E - Diagramm zu erwarten, wenn die Bodenstein-Hypothese für diesen Stoff angenommen werden darf. - Da aber die Lösung während der Reaktion gelb wird, vermutlich also p-Nitrophenolat gebildet wird, muss noch ein anderer Prozess eine Rolle spielen.

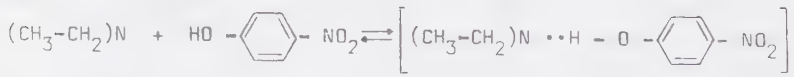
Es wurde p-Nitrophenol ($3 \cdot 10^{-4}$M) in Acetonitril vorgelegt und mit TAA ($3 \cdot 10^{-3}$M) titriert (Apparatur[25]). Die wegen der Titration volumenkorrigierten E - Diagramme der Wellenlängenkombinationen in nm 420/450 ; 420/440 ... 420/380 sind z.gr.T. gekrümmt, d.h. im System liegen mindestens 2 Gleichgewichte vor, die sich spektroskopisch bemerkbar machen (Charge transfer-Komplexe sind nicht auszuschliessen). -

In nicht-wässrigen Medien treten oft Homo- und Heterokonjugationen auf [26,27,28].

Im Fall der Homokonjugation [29,30,31] kann das Gleichgewicht diskutiert werden:



und im Fall der Heterokonjugation [29,30,31]:



[+)] Das deuterierte Acetonitril wurde zweimal mit Molechularsieb 3 $\overset{\circ}{A}$ Perlform (Merck) entwässert und anschliessend destilliert

Diese Gleichgewichte können die Krümmung im E - Diagramm erklären, da die Stoffe rechts vom Gleichgewicht unterschiedlich spektroskopisches Verhalten i.Vgl. zu p-Nitrophenol zeigen. Ob weitere Gleichgewichte in Betracht gezogen werden müssen (z.B. Charge tranfer-Komplexe), wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Auf jeden Fall kann festgestellt werden, dass bei Reaktionssystemen mit im Ueberschuss zugegebenem TAA zusätzliche Komplikationen auftreten, die bei der kinetischen Analyse berücksichtigt werden müssen (vgl.die Reaktion mit Gly-äthylester•HCl mit TAA ($5 \cdot 10^{-3}$M), Tab.11).

3. Die Reaktion von Tetra-n-butylammoniumhydroxid mit Boc-gly-ONP

Um den im Abschnitt IV.2. diskutierten Hydroxyl-Einfluss auf Boc-gly-ONP studieren zu können, wurde das in Acetonitril gut lösliche und sehr basische Tetra-n-butylammoniumhydroxid gewählt. Der Vorteil bei dieser Substanz liegt darin, dass die Substanz als Masslösung (0,1N,in Propanol-(2)/Methanol, Schuchardt-Merck) bezogen werden kann.

Die Reaktion wurde bei gleichen Ausgangskonzentrationen ($5 \cdot 10^{-5}$M) in Acetonitril gestartet. Das Reaktionsspektrum zeigt am Anfang der Reaktion bei der Wellenlänge 269 nm ein ausgeprägtes Maximum, während und gegen Ende der Reaktion bei den Wellenlängen 426 und um 240 nm. In den ersten Stunden treten scharfe Isosbesten bei den Wellenlängen 307, 247 und 222 nm auf, die aber mit zunehmender Reaktionszeit immer unschärfer werden. -
Die Reaktion läuft am Anfang sehr schnell, wird aber dann immer langsamer. Nach 10 Tagen ist die Reaktion noch nicht beendet. Die E -Diagramme der Wellenlängenkombinationen in nm 420/440 ; 420/410 ; 420/270 und 420/235 sind fast überall linear. Lediglich gegen "Ende" der Reaktion tritt eine geringfügige Abweichung vom linearen Verlauf auf. Die Reaktion kann als "spektroskopisch einheitlich" angesehen werden.Man würde also die Reaktion

Boc-gly-ONP + Tetra-n-butylammoniumhydroxid ⟶
Boc-glycin + Tetra-n-butylammonium-p-nitrophenolat

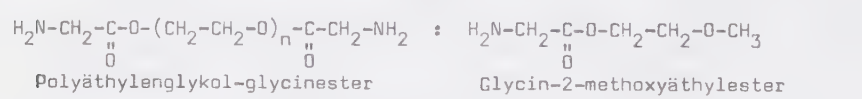
erwarten. (Da das als Lösungsmittel hier eingesetzte Acetonitril dreimal mit Molekularsieb (Perlform 3 Å, Merck) behandelt und dann destilliert wurde, ist anzunehmen, dass das Acetonitril "praktisch" wasserfrei ist. Reaktionen mit Wasser wurden deswegen ausgeschlossen.) Das

E_1 , $(E_1-E'_{01})/(t-t')$ - Diagramm zeigt aber einen ganz anderen Kurvenverlauf, als man zunächst annehmen würde: die bei den verschiedenen Wellenlängen aufgestellten Kurven sind nicht linear, sondern sigmoid. Besonders gegen "Ende" der Reaktion ist die Abweichung besonders gross: die E_1-Achse scheint Asymptote zu sein (s.Abb.15).

Die oben angenommene Zersetzungsreaktion von Boc-gly-ONP mit Tetra-n-butylammoniumhydroxid ist also komplizierter. - Die langwellige Absorption (Maximum bei 426 nm) spricht für die Bildung des Ionen-paares Tetra-n-butylammonium-p-nitrophenolat (s.Abschnitt IV.2., Absorption von Natrium-p-nitrophenolat bei 417 nm). Welche langsame Reaktion sich hier noch bemerkbar macht, wurde nicht festgestellt. Es sollte lediglich geprüft werden, ob die Reaktion von Hydroxyl-Ionen mit Boc-gly-ONP allein die Krümmung der E-Diagramme bei der Reaktion Boc-gly-ONP mit TAA (s.Abschnitt IV.2.) erklären kann, was also zu verneinen ist.

4. Die Reaktion von Boc-gly-ONP mit Glycin-2-methoxyäthylester·HCl

Bevor die Peptidsynthese nach der "liquid phase" Methode näher analysiert wird, soll die Reaktion von Boc-gly-ONP mit Glycin-2-methoxyäthylester·HCl (+ TAA) untersucht werden. Diese Reaktion stellt den Uebergang zwischen dem klassischen Peptidsystem und dem "liquid phase" System her. Im "liquid phase" System werden als Aminkomponenten Polyäthylenglykole, die mit der Carboxylgruppe der Aminosäuren esterartig verbunden sind, eingesetzt. Als kleinste Einheit der Polyäthylenglykolglycinester ist das Glycin-2-methoxyäthylester anzusehen:



Die E - Diagramme der Reaktion Boc-gly-ONP + Glycin-2-methoxyäthylester·HCl (+TAA) sind linear. Die Kurven der Gl.(29) haben bei den untersuchten Wellenlängen den Habitus der Abb.14 (m), die der Gl.(43) sind am Anfang nach oben etwas gekrümmt.

Auffallend ist der kleine Wert der Geschwindigkeitskonstanten (s. Tab.11). Er ist ungefähr halb so gross wie der der Reaktion mit Glycinäthylester·HCl. Offenbar erniedrigt die Methoxy-Gruppe am Glycin-äthyl-

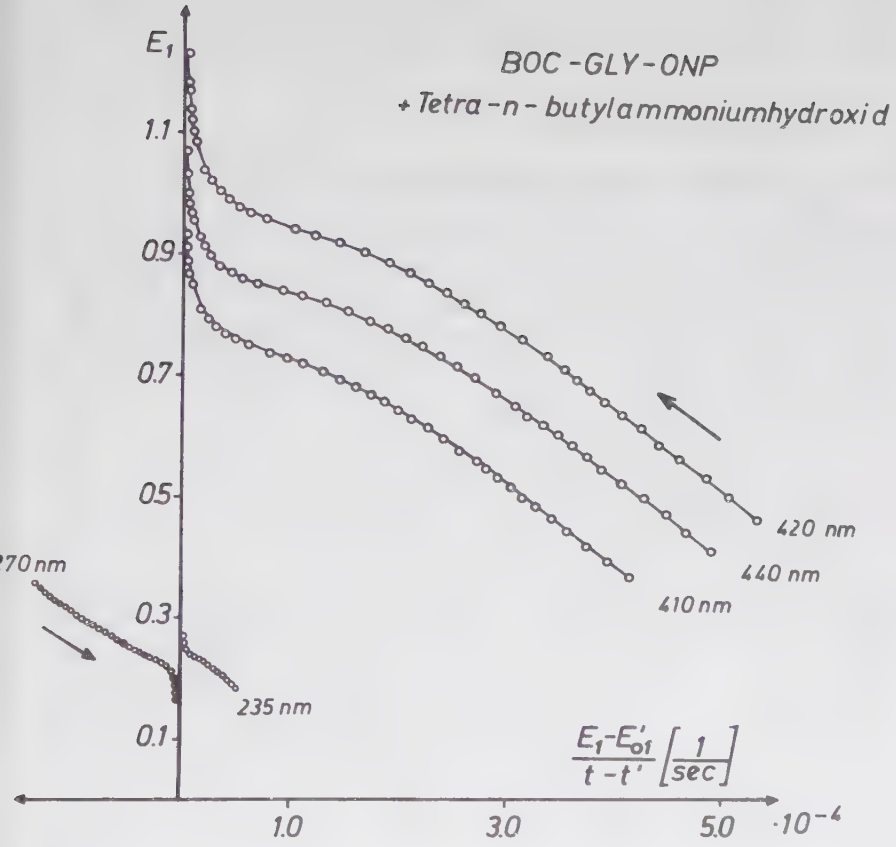


Abb.15: Das Diagramm der Gl.(29) der Reaktion Boc-gly-ONP mit Tetra-n-butylammoniumhydroxid (b.5.10^{-5}M ; Acetonitril: 25,0 $\pm$ 0,2 ^{o}C) bei den Wellenlängen 235,270,410,420 und 440 nm.

ester die Reaktivität der Aminogruppe durch - I-Effekt so stark. Würde man nach diesem Verhalten auf die Umsatzgeschwindigkeit mit den Polyäthylenglykol-glycinester-Verbindungen schliessen, so wäre zu erwarten, dass die k - Werte im "liquid phase" System (s.Abschnitt V.5,) generell kleiner sind als die im "klassischen" Peptidsystem.

5. Das "liquid phase" System

5.1. Die Reaktion von Boc-gly-ONP mit PAG-glycinester

I.Ggs. zum System der "klassischen" Peptidsynthese sind im "liquid phase" System die Aminkomponenten nicht mit niedermolekularen Alkoholen (z.B. tert.Butyl-, Äthylalkohol, s.Abschnitt IV.1., Tab.11), sondern mit hochpolymeren Hydroxyl-Verbindungen verestert. Dabei werden als Endgruppe der Alkohole z.B. Polystyrole [32] eingesetzt. Diese hochpolymeren Komponenten haben 3 Nachteile:

1. ungünstig spektroskopisches Verhalten
2. wenig solubilisierende Eigenschaften (z.B. unlöslich in Wasser)
3. bezüglich der Reaktion verhalten sich solche Systeme nicht homogen, sondern polyvalent (Lit.32))

Alle diese Nachteile werden vermieden, wenn als Polymere Polyäthylenglykole (PAG) eingesetzt werden, die mit der Carboxylgruppe der Aminosäuren verestert sind [33,34,35]. Polyäthylenglykol absorbiert im nahen UV-Gebiet praktisch nicht. Die am Polymer synthetisierten Peptide sind sowohl in Wasser als auch in aprotischen Lösungsmitteln gut löslich (dies ist z.B. für die in der Synthese anschliessende Ultrafiltration wichtig). Dadurch, dass die funktionellen Gruppen am Anfang und Ende dieser linearen Homopolymere liegen, verhält sich das System chemisch homogen.

Es ist für die präparative Peptidsynthese von Bedeutung zu wissen, ob das "liquid phase" System gegenüber der "klassischen" Peptidsynthese bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit benachteiligt ist oder nicht.- Um weiter den Einfluss der Polymerenlänge bei der Reaktion zu studieren, wurde als Molgewicht des Polyäthylenglykols 20 000, 10 000, 6 000, 4 000 und 2 000 gewählt.

In Abb.16 ist das E_1 , $(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramm der Reaktion Boc-gly-ONP mit PAG(10 000)-glycinester·HCl [+)] (+ TAA) in Acetonitril

[+)] Das Molgewicht des PAG ist in der Klammer angegeben

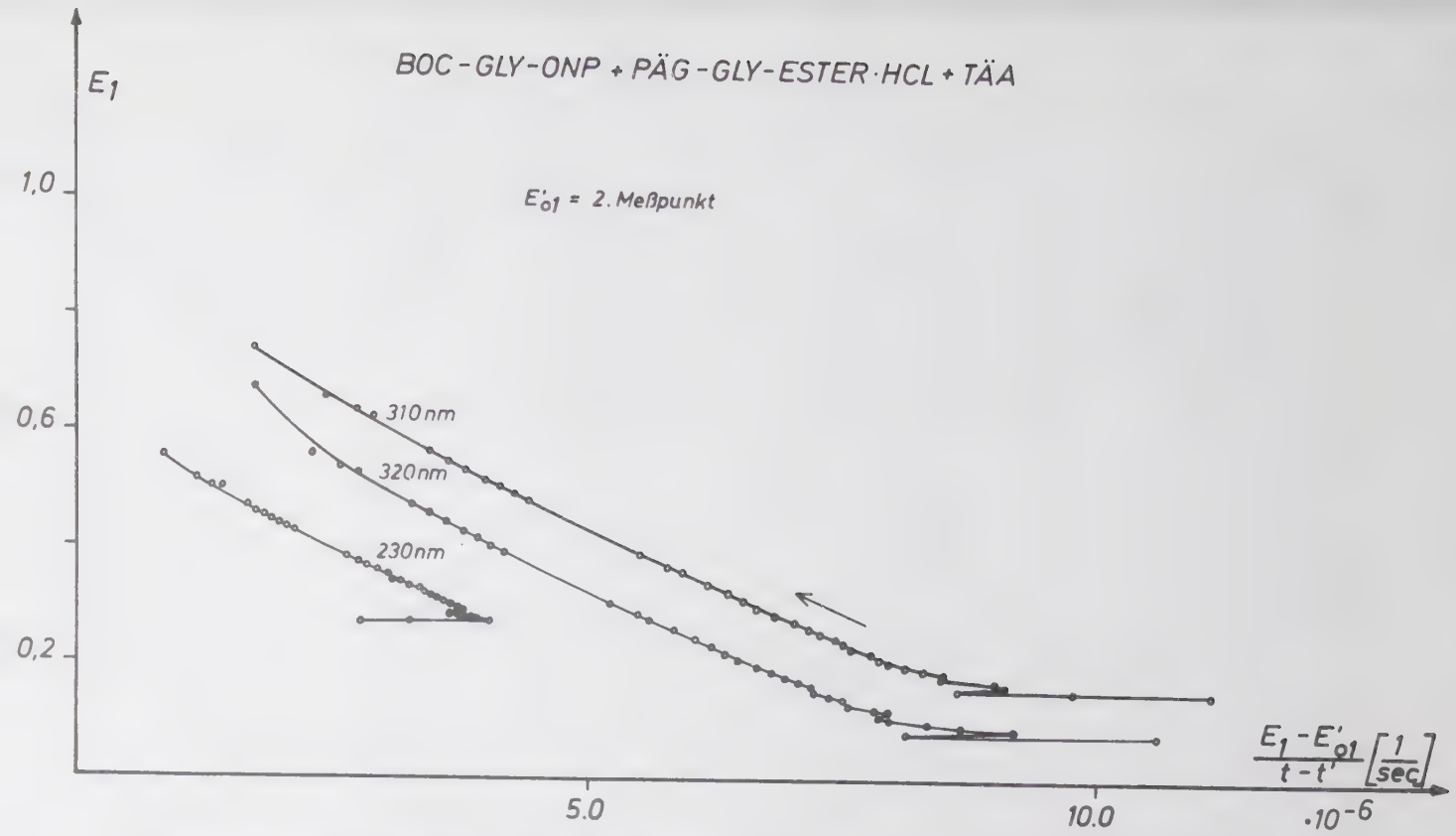


Abb.16: Das Diagramm der Gl.(29) der Reaktion Boc-gly-ONP mit PAG(10 000)-glyester·HCl (b. 10^{-3}M) und TAA ($1{,}05 \cdot 10^{-3}$M) bei den Wellenlängen 320,310 und 230 nm. Acetonitril: 25,0 ± 0,2 °C

bei den Wellenlängen 320, 310 und 230 nm angegeben. Besonders zu Reaktionsbeginn treten Abweichungen vom linearen Verlauf auf ähnlich wie im "klassischen" Peptidsystem (vgl.Abschnitt IV.1. und Abb.14). Nur sind diese hier stärker ausgeprägt. - In entsprechender Weise sind auch grössere Abweichungen in den Diagrammen der Gl.(43) zu registrieren (wie in Abschnitt IV.1. sind diese auch ausgeprägter und treten grundsätzlich oberhalb der Ausgleichsgeraden auf (s.Abb.13)). Die E - Diagramme können i.a. als linear angesehen werden. In wenigen Fällen treten ab 5o - 6o% Reaktionsumsatz Abweichungen von der Geraden auf.
In Abb.14 ((f), (g), (h), (1)) sind die Kurven der Gl.(29) der konstanten Wellenlänge 320 nm bei den Reaktionen mit den Homopolymeren aufgetragen. - In Tab.11 sind die nach Gl.(29) und (43) bestimmten Geschwindigkeitskonstanten angegeben. Es fällt auf, dass diese ungefähr genau so gross sind wie die im "klassischen" Peptidsystem. Es kann also festgestellt werden, dass das "liquid phase" System gegenüber den "klassischen" Peptidsynthese-Methoden hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit nicht benachteiligt ist. Weiter ist festzuhalten, dass störende Einflüsse sich in beiden Systemen bemerkbar machen (vgl. Abb.14). - Welche Ursachen hierbei eine Rolle spielen, wird in Abschnitt IV.6. näher diskutiert.

Die k - Werte in Tab.11 werden mit abnehmendem Molgewicht der Polymere grösser. Besonders zwischen dem Molgewicht 6 000 und 4 000 ist eine Zunahme zu beobachten. Eine merkliche Steigerung der Geschwindigkeitskonstante zwischen den Polymeren 4 000 und 2 000 ist nicht festzustellen. Offenbar liegt zwischen diesen Molgewichten das für die Reaktionsgeschwindigkeit günstigste Polymerenmolgewicht.
Der Grund für die Zunahme von k mit abnehmender Polymerenlänge liegt in folgendem: die Viskosität der Lösung nimmt mit kleinerem Molgewicht des Polymers ab. Je kleiner die Zähigkeit der Lösung ist, umso grösser ist die Stosszahl der Moleküle und damit k.

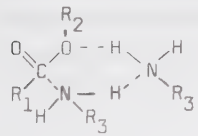
5.2. Die Reaktion von Boc-gly-ONP mit PAG(20 000)-$(gly)_3$·HCl

Diese Reaktion wurde deshalb untersucht, um die mögliche Konkurrenzreaktion zu Diketo-piperazin auszuschliessen. Die Diagramme der Gl.(29) (s.Abb.14 (e)) und (43) sowie die E - Diagramme zeigen die gleichen Anomalien, wenn auch geringer, wie sie bisher beschrieben wurden (s.Abschnitt IV.1. und IV.5.1.).

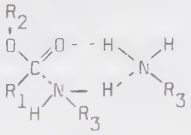
Die Geschwindkeitskonstante dieser Reaktion ist ungefähr doppelt so gross wie die der schnellsten PAG-monoglycinester-Reaktion ! Das ist überraschend. Greift das PAG hier katalytisch ein ?

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Ausgangsstoffe und das gebildete Peptid im Ueberschuss katalytisch wirken, wohingegen das entstehende p-Nitrophenol die Reaktion hemmt [36]. Die Hemmung des im Ueberschuss zugefügten p-Nitrophenols steht mit einer Protonierung der noch nicht umgesetzten Aminkomponente im Zusammenhang:

Das protonisierte Amin kann praktisch nicht umgesetzt werden. - Der katalytische Einfluss der bei der Reaktion beteiligten Stoffe wird mit den Eigenschaften der "tautomeren" Katalysatoren erklärt [20,37]. Wird der Reaktionspartner der Aminkomponente im Ueberschuss zugegeben, so wird der schnellere Reaktionsumsatz dadurch erklärt, dass folgende Uebergangszustände gebildet werden [37,38]:



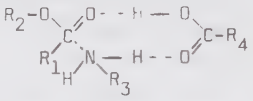
I



II

Im Uebergangszustand I wird ein Proton vom Amin, das acyliert wird, abgespalten und auf das 2.Amin übertragen, während dieses gleichzeitig ein Proton auf die Alkoholverbindung überträgt. Im II. Komplex wird das "Aminproton" von der Carbonylgruppe des Esters aufgenommen. Die Nukleophilie der Carbonylgruppe ist erhöht und der Angriff des Amins erleichtert. Welcher Zwischenzustand tatsächlich eingenommen wird, kann in der

Literatur nicht eindeutig entschieden werden.
Im Fall der Katalyse durch Peptide sind die in I und II eingezeichneten Amine durch Amide zu ersetzen.
Für die Katalyse der im Ueberschuss zugegebenen Esterkomponente oder allg. Carbonsäure wird in Lit.37) folgender cyclische Uebergangszustand diskutiert:



III

Es ist denkbar, dass im Fall der PAG(20 000)-$(gly)_3$·HCl-Reaktion ähnliche Zwischenzustände eingenommen werden, wie in I, II und III dargestellt ist. Dabei wäre die Carbonsäure oder das 2.Amin durch die Polyäthylen-Aetherbrücke zu ersetzen. Offenbar wären aber nur dann solche Uebergangszustände möglich, wenn diese über mehrere Peptidgruppen durch Wechselwirkung mit den Aethergruppen des Polymers stabilisiert werden. Dabei kämen Wasserstoffbrücken zwischen den Amidgruppen der Peptide und den Aetherbrücken des Polymers in Betracht. Durch diese Fixierung könnte dann die Nukleophilie der Aminogruppe der Aminkomponente erhöht werden entsprechend der angegebenen Zwischenzustände.
Sollte dies zutreffen, so könnten noch wirksamere, polymere Träger entwickelt werden. Wenn am Ende der Polyäthylenglykole kurze perlonähnliche Stücke ($-NH-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-(CH_2)_n-)_m$ ankondensiert werden, dürfte die gewünschte Wasserstoffbrückenbindung zwischen Peptid und Polymer weiter verstärkt und damit eine grössere Reaktionsgeschwindigkeit erzielt werden. - Andere Polymere (z.B. Poly-glycin) mit ähnlichen Fixierungseigenschaften sind denkbar.

6. Diskussion der Nebeneffekte

In den Abschnitten IV.1. ("klassische" Peptidsynthese) und IV.5. ("liquid phase" System) wurde gezeigt, dass die untersuchten Reaktionen nicht streng nach dem Mechanismus A+B → C+D ablaufen, sondern zusätzliche Nebeneffekte berücksichtigt werden müssen. Wie z.T. schon diskutiert wurde (s.Abschnitt IV.2.; IV.3.; IV.5.2.), kommen hierfür mehrere Punkte in Betracht. Zusammenfassend wird zur Diskussion gestellt:

1. Relativ grosse Fehler der Messwerte zu Reaktionsbeginn
Innerhalb der ersten halben Stunde nach dem Start der Reaktion wurden i.a. 3 - 6 Messungen durchgeführt. Dabei änderte sich die Extinktion jeweils zwischen 0,005 - 0,02. Die Extinktionen zwischen den Werten 0 - 0,1 und 1,2 und grösser sind mit zusätzlichen Fehlern behaftet (Badewannenkurven [13]). Da bei der Wellenlänge 320 nm die Startextinktion immer unter 0,1 lag, kommt zumindestens bei dieser Wellenlänge dieser Gesichtspunkt in Betracht.
Zu Beginn der Reaktion ist die Zeitdifferenz klein und damit der Quotient $((E_1 - E'_{01})/(t - t'))$ der Gl.(29) relativ gross (vgl. Abb.2, 3, 12, 14, 15, 16). Zeitfehler machen sich also gerade am Anfang der Reaktion bemerkbar.

2. Wasser (bzw. Hydroxyl-Ionen) als Verunreinigung in Acetonitril
Dieser Punkt wurde in den Abschnitten IV.2. und IV.3. ausführliche behandelt.

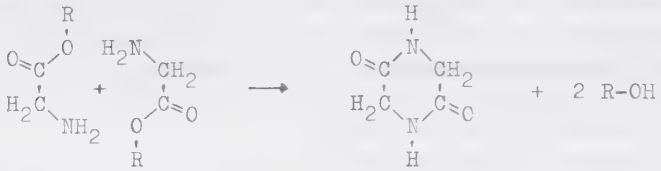
3. Einwaagefehler
Dies trifft aber nicht für den Kurvenverlauf der E - Diagramme zu, da diese unabhängig von der Konzentration linear sein müssen.
Diese Fehlerquelle trifft auch für die Polyäthylenglykol-glycinester zu, obwohl diese in einer Menges von ca. 100 mg (auf 10 ml Acetonitril) eingewogen wurden. Die Beladung des Polymers mit Aminogruppen wurde mit Hilfe der bekannten "Ninhydrin"-Reaktion [39] bestimmt. Die einzuwiegende Menge an Polymer richtet sich also nach der "Beladungszahl".

4. Hetero- und Homokonjugation
Diese Gleichgewichtsreaktionen sind im Abschnitt IV.2. behandelt worden.

5. Verteilung des Molekulargewichtes der Polymeren
Wie aus Tab.11 zu sehen ist, reagieren Polymere mit kleinerem Molgewicht schneller. Das die eingesetzten Polymere hinsichtlich der Polymerenlänge nicht definiert hergestellt werden können, sondern nach der Gaussfunktion um einen wahrscheinlichsten Wert verteilt vorliegen, existieren also streng genommen soviel Teilreaktionen, wie Polymere verschiedener Länge im Reaktionssystem vorkommen.
Hiermit steht der Befund im Einklang, dass die Reaktion anfangs zu schnell abläuft (s.Abschnitt IV.1.): zuerst reagieren die Polymere kleinerer Länge bevorzugt ab.

6. Viskosität der Lösung
Dies trifft besonders für das "liquid phase" System zu. Ueber diesen Gesichtspunkt ist im Abschnitt IV.5.1. diskutiert worden.

7. Nebenreaktionen wie z.B. die Diketo-piperazin-Bildung
Aminosäuren und Dipeptide können unter sich zu Diketo-piperazinen reagieren. Tri- und Oligopeptide können dies aus statistischen Gründen praktisch nicht. Die Reaktion zu Diketo-piperazin ist folgende:



2 Glycin-ester → Piperazindion + 2 Alkohol

Um diese Konkurrenzreaktion zu unterdrücken, wurden als Aminkomponenten $(Gly)_3$-äthylester·HCl und PAG(20 000)-gly·HCl eingesetzt (s.Tab.11). Trotzdem konnten bei den Diagrammen der Gl.(29) und (43) Abweichungen vom linearen Verlauf registriert werden.

8. Wechselwirkung von p-Nitrophenol mit dem Polymer
Bemerkenswert ist, dass die Extinktionsänderung bei den gewählten Wellenlängen (320, 310, 270, 265, 260, 230 nm) für einen bestimmten Umsatz bei der Reaktion mit der Aminkomponenten PAG(20 000)-$(gly)_3$·HCl wesentlich kleiner ist als bei allen anderen untersuchten Reaktionen. Offensichtlich steht das im Zusammenhang mit dem entstehenden p-Nitrophenol, da die Extinktionen zur Zeit t = 0 bis auf die Wellenlänge 230 nm innerhalb

der Fehlergrenze mit denen der anderen Reaktionen übereinstimmen.

Die aufgezählten Nebeneffekte machen sich in den untersuchten Systemen unterschiedlich bemerkbar. - Als Ergebnis ist festzuhalten, dass wegen der auftretenden Anomalien in den aufgestellten Diagrammen, die Geschwindigkeitskonstanten im "klassischen" und "liquid phase" System nur als Orientierungsdaten anzusehen sind (s.Tab.11) und nicht die Genauigkeit der n-Butylamin-Reaktion erreichen (s.Abschnitt III.).

V. Auswertungsprogramme (in CDC-FØRTRAN)

1. Beschreibung des "FØRMALIN"-PRØGRAMMES

Der Name "FØRMALIN" ist die Abkürzung für Formale Integration. Das Programm ist in MS-FØRTRAN [40] und dem kompatiblen USASI-FØRTRAN (Lit.41)) geschrieben und im Rechenzentrum Tübingen [+] auf einer CDC 3304 (Control Data GmbH) getestet worden. -

Das "FØRMALIN"-PRØGRAMM berechnet die in Gl.(43) auftretenden Grössen und berechnet die Geschwindigkeitskonstante k nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Zunächst werden die E - Diagramme aller gemessenen Wellenlängen, bezogen auf eine Wellenlänge (möglichst die mit der grössten Extinktionsänderung während der Reaktion), berechnet und eine Ausgleichsgerade durch diese gelegt. Die um diese Gerade streuenden Messpunkte werden wie folgt korrigiert: es wird das Lot auf die Ausgleichsgerade durch die entsprechenden Messpunkte im E - Diagramm gefällt und der Schnittpunkt dieser Geraden als korrigierter Punkt im E - Diagramm angesehen.

Die Konzentrationen der Stoffe A und C der Reaktion $A+B \rightarrow C+D$ (beachte aber Gl.(35)) werden über die entsprechenden Streckenverhältnisse der Ausgleichsgeraden im E - Diagramm nach Gl.(36) und (37) berechnet. Dann werden die entsprechenden logarithmischen Ausdrücke und Integrationsglieder der Gl.(43) berechnet. Die numerische Integration erfolgt mit der korrigierten Trapezregel, die in Lit.13) genau beschrieben ist.
Die Grösse k wird mittels einer Ausgleichsgeraden durch das y,x -Diagramm der Gl.(43) berechnet. - Diese Rechenoperationen werden bei allen Wellenlängen (mit Ausnahme der Referenzwellenlänge für das E - Diagramm) ausgeführt. Für jede Ausgleichsgerade der Gl.(43) kann eine "mittlere Streuung" [8] angegeben werden. Damit kann jedes k bei jeder Wellenlänge gewichtet werden und die wahrscheinlichste Geschwindikeitskonstante errechnet werden [8]. Alle so errechneten k - Grössen werden u.a. ausgedruckt.
Die Grössen y und x der Gl.(43) werden für jede Wellenlänge geplottet. Das Plotterprogramm stammt von G.Gauglitz.

[+] Den Mitarbeitern des Rechenzentrums der Universität Tübingen, besonders Herrn Schill, sei für wohlwollende Unterstützung gedankt

2. Zusammenfassung der benutzten Programme

DIGIMESS: (nach H.J.Niemann)
Uebersetzt die Messdaten vom Lochstreifen und puncht diese auf Lochkarten, die für die nachfolgenden Programme benötigt werden.

SYNCHRØ: (nach H.J.Niemann und J.Polster)
Die $E_1(t)$ - Messreihen (bis zu 10 Wellenlängen) werden durch successive Polynom-Interpolation auf dieselbe Reaktionszeit (bezogen auf die erste Wellenlänge) synchronisiert.

KINPLØT: (nach H.J.Niemann)
Plottet E -, ED - $^{6,7)}$ und EDQ - $^{6,7)}$ Diagramme mit Formatoptimierung.

EDTQ 1: Berechnet die Geschwindigkeitskonstanten nach Gl.(27) über q_1 (maximal 7 Wellenlängen) und plottet die $E_1,(E_1 - E'_{01})/(t - t')$ - Diagramme. Plotterprogramm nach G.Gauglitz.

EDTQ 2: Berechnet die Geschwindigkeitskonstante k nach Gl.(29) und (32). Bei n Messdaten pro Wellenlänge (maximal 7) können nacheinander (n - 5) Messdaten als E'_{01} eingesetzt werden: jeder k - Wert im so entwickelten $E_1,(E_1-E'_{01})/(t-t')$-Diagramm wird über die Streuung der Ausgleichsgeraden (Lit.8)) mit einem Gewicht versehen und hierüber der wahrscheinlichste k - Wert berechnet. Entsprechend wird der wahrscheinlichste $E_{\infty 1}$ - Wert bestimmt.

FØRMALIN: S.Abschnitt V.1.
Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten aus den Gl.(33), (54), (55) wurde das "FØRMALIN"-PRØGRAMM geringfügig geändert.

EXTDIFGL: Berechnet die Geschwindigkeitskonstante nach Gl.(60) mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate.

KINALYSE: (nach H.J.Niemann [10,13])

Die Konstanten Z_1, Z_2, Z_3 der Gl.(46) werden u.a. berechnet. Durch Simulation kann über die Signifikanz der Extinktions-Zeit-Diagramme der angenommene Mechanismus zusätzlich geprüft werden.

C) ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene neue Methoden zur kinetischen Analyse von Reaktionen des Types A+B ⟶ C+D wurden entwickelt. Diese Auswerteverfahren haben den Vorteil, bei spektralphotometrisch untersuchten Reaktionen von den Extinktionskoeffizienten unabhängig zu sein. - Hierbei werden verschiedene mathematische Methoden zur Lösung der kinetischen Differentialgleichung angewendet:

1. Lösung der Extinktions- und Konzentrations-Differentialgleichung mittels geschlossener Integration
2. Lösung der Extinktions- und Konzentrations-Differentialgleichung mit Hilfe der Formalen Integration
3. Ueberführung der Extinktions- und Konzentrations-Differentialgleichungen in die entsprechenden Differenzengleichungen

Die Fälle gleicher und ungleicher Einwaagekonzentrationen der Ausgangskomponenten müssen bei der Methode der Formalen Integration nicht unterschieden werden. Bei der Formalen Integration der Konzentrationsgleichung müssen nur die Konzentrationen eines Ausgangsstoffes bekannt sein, die des anderen lassen sich berechnen. Dies ist bei den bisherigen Methoden nicht möglich. - Falls die Extinktionen zur Zeit $t = 0$ und $t \to \infty$ bekannt sind, können die Konzentrationen der im Unterschuss vorliegenden Ausgangskomponente über die Extinktionen oder mit Hilfe der E - Diagramme bestimmt werden.

Sämtliche obigen Verfahren wurden zunächst am Beispiel der Aminolysereaktion Boc-glycin-p-nitrophenolester mit n-Butylamin in Acetonitril als Lösungsmittel getestet. Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden stimmen gut überein.

Anschliessend wurden die Peptidsynthese-Reaktionen (Acetonitril als Lösungsmittel) im "klassischen" und "liquid phase" System untersucht. Bei der "klassischen" Synthese wurden niedermolekulare Aminkomponenten (Glycin-tert.butylester, Glycin-äthylester, Triglycin-äthylester), bei der "liquid phase" Methode Polyäthylenglykol-glycinester mit dem Polymermolgewicht 20 000, 10 000, 6 000, 4 000 und 2 000 eingesetzt.

Für die kinetische Analyse dieser Reaktionen haben sich das E_1 , $\Delta E_1/\Delta t$-Diagramm und die Formale Integration der Konzentrationsgleichung bewährt.

Das $E_1, \Delta E_1/\Delta t$ - Diagramm darf nur bei Reaktionen mit gleichen Ausgangskonzentrationen der Reaktionspartner angewendet werden. Da diese Bedingung bei allen Pepti^{-}-Kupplungsreaktionen eingehalten wurde, konnte mit Hilfe des $E_1, \Delta E_1/\Delta t$ - Diagramm die Extinktion zur Zeit $t \rightarrow \infty$ ($E_{\infty 1}$) ermittelt werden, die für die Bestimmung der Konzentration bekannt sein muss.

In den konstruierten Diagrammen traten sowohl im "klassischen" als auch im "liquid phase" System Abweichungen vom linearen Verlauf auf. Für diese Nebeneffekte werden verschiedene Deutungen diskutiert. Hierbei ergab sich eine neue Möglichkeit zur Peptidsynthese über Trialkyl-acyl-ammoniumsalze.

Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten zeigt, dass die im "liquid phase" System eingesetzten Polyäthylenglykol-glycinester ebenso schnell umgesetzt werden wie die niedermolekularen Aminkomponenten bei der "klassischen" Synthese.- Besonders auffallend ist die hohe Geschwindigkeitskonstante im Falle der Reaktion mit Polyäthylenglykol - triglycinester (Molgewicht des Polymers: 20 000). Hierfür werden verschiedene Interpretationsmöglichkeiten diskutiert.

D) ANHANG

I. Kinetische Messungen

Geräte und Messvorgang

Die Reaktionsspektren wurden mit dem Registrierenden Spektralphotometer DMR 21 WL (Fa. Zeiss) mit temperierbarem Küvettenhalter aufgenommen.
Die Mehrwellenlängen-Messungen wurden am Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit Doppelmonochromator MM 12, Spaltautomatik und temperierbarem Küvettenhalter durchgeführt. Es wurde die Wolframlampe für den Wellenlängenbereich 360 nm und die Deuteriumlampe für 360 nm verwendet.
Die Messzeiten und Extinktionswerte wurden digital erfasst und per Locher auf Lochstreifen gestanzt. Dieser Apparate-Aufbau ist in Lit.42) beschrieben.
Bei den Reaktionen, die in den Abschnitten III., IV.2. und IV.3. untersucht wurden, wurden 1 cm Quarzküvetten mit Teflonstopfen (Fa. Hellma, Nr. 110 QS) verwendet, bei allen anderen Reaktionen 1 mm Quarzküvetten - ebenfalls mit Teflonstopfen versehen (Fa. Hellma, Nr. 110 QS).

Wiederholt wurden die Extinktionen bei den Wellenlängen 320, 310, 270, 265, 260 und 230 nm gemessen. Nur bei der Reaktion im Abschnitt IV.2. wurden die Wellenlängen 430, 420, 320, 310, 270 und 265 nm und im Abschnitt IV.3. die Wellenlängen 440, 420, 410, 270 und 235 nm gewählt.

Die Reaktion wurde wie folgt gestartet: 3 ml Acetonitril wurden bei der n-Butylamin-Reaktion in die 1 cm-Küvette vorgelegt und in diese mit einer Konstriktionspipette 0,03 ml n-Butylamin (Stammlösung: 50 ml, $9 \cdot 10^{-3}$M bzw. $2 \cdot 10^{-2}$M) und 0,03 ml Boc-gly-ONP (Stammlösung: 10 ml, $9 \cdot 10^{-3}$M bzw. 10^{-2}M) eingespritzt. Es wurde umgeschüttelt und die Zeituhr gestartet. - Bei allen Reaktionen, bei denen 1 cm-Küvetten verwendet wurden, ist in dieser Weise verfahren worden. Nur die Konzentrationen der Stammlösungen waren verschieden. Diese betrugen bei der Tetra-n-butylammoniumhydroxid-Reaktion (Abschnitt V.3.) $5 \cdot 10^{-3}$M (10 ml Stammlösung sowohl bei der Boc-gly-ONP- als auch bei der Hydroxid-Lösung) und bei der TAA-Reaktion (Abschnitt V.2.) $4 \cdot 10^{-1}$M (TAA-Stammlösung: 10 ml) und 10^{-2}M, $2 \cdot 10^{-2}$M (Boc-gly-ONP-Stammlösung: 10 ml).

Alle anderen Reaktionen wurden in 1 mm-Quarzküvetten verfolgt. Die Ausgangskonzentrationen der Reaktionskomponenten waren überall gleich. Die Konzentrationen der Stammlösungen bei Boc-gly-ONP und TAA waren um den Faktor 100 grösser als die in der Tab.11 angegebenen Konzentrationen. Die hergestellten Konzentrationen der Aminkomponenten entsprechen den in Tab.11 aufgezeichneten Werten. (Gly-äthylester·HCl löst sich nur dann in Acetonitril, wenn die entsprechende Menge TAA zugegeben wird; bei Gly-2-methoxyäthylester·HCl ist die Zugabe von TAA ebenfalls vor dem Start der Reaktion zu empfehlen.) - Die Reaktionen wurden gestartet, indem 3 ml der Aminkomponenten-Lösung in einer 1 cm-Küvette vorgelegt und mit einer 30 μl-Konstriktionspipette die entsprechenden Mengen TAA und Boc-gly-ONP eingespritzt wurden. Mit einer 1 ml-Pipette wurde nach dem Umschütteln der Reaktionslösung eine kleine Menge entnommen und die 1 mm-Küvette gefüllt. Mit einer speziell hergestellten Metallspange wurden die 1 mm-Küvetten im Küvettenhalter fixiert.

In der Vergleichsküvette befand sich immer Acetonitril.

Temperiert wurde mit einem Haake-Umwälzthermostaten FP. Die Temperatur betrug im Küvetteninneren immer 25,0 $\pm$ 0,2 ^{o}C.

Das verwendete TAA wurde von Herrn Dr.Mutter und Herrn Dr.Uhmann eine halbe Stunde unter Rückfluss über Naphtylisocyanat gekocht und dann destilliert. Damit kann die Anwesenheit von Di- und Monoaminen in TAA ausgeschlossen werden.

Z.T. wurde Acetonitril 3-4 mal mit Molekularsieb (Perlform, 3 $\overset{o}{A}$, Merck) behandelt und zwar je 1-2 Tage, dann destilliert. - Die Reaktionen im "liquid phase" System wurden im so behandelten Acetonitril durchgeführt, ebenso die Reaktion mit Triglycin-äthylester (s.Abschnitt IV.1.).

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Abadian und Frau Stephani für die sorgfältig gezeichneten Abbildungen und bei Frau Steinberg für die ordentliche Abschrift dieser Arbeit.

II. Substanzen

Acetonitril, Uvasol Fluka und Uvasol Merck

Molekularsieb, Merck, 3 Å, Perlform

n-Butylamin, Fluka puriss.

tert.Butyloxycarbonyl-glycin-tert.butylester·HCl (Boc-gly-ONP), Fluka puriss.

Glycin-tert.butylester·HCl, Fluka puriss.

Glycin-tert.butylester ohne HCl, von den Herren Dr.Mutter und Dr.Uhmann hergestellt

Glycin-äthylester·HCl, Fluka puriss.

Triäthylamin (TAA), Fluka puriss.

Tetra-n-butylammoniumhydroxid (0,1N, in Propanol-(2)/Methanol), Merck

p-Nitrophenol, Merck

Alle anderen Substanzen sind von Herrn Dr.Mutter und Herrn Dr.Uhmann vom Organisch-chemischen Institut der Universität Tübingen hergestellt worden.

F) LITERATURVERZEICHNIS

1) Sterberg,J.C., Stillo,H.S., Schwendemann,R.H., Anal.Chem. 32, 84 (1960)

2) G.Weber, Nature 190, 27 (1961)

3) Ainsworth,S., J.Phys.Chem. 65, 1968 (1961); 67, 1613 (1963)

4) Katakis,D., Anal.Chem. 37, 876 (1965)

5) H.Mauser, B.Nickel, U,Sproesser und V.Bihl, Z.Naturforsch. 22b, 903 (1967)

6) H.Mauser, Z.Naturforsch. 23b, 1021 (1968)

7) H.Mauser, Z.Naturforsch. 23b, 1025 (1968)

8) H.Mauser, Ullmanns Enzyklopädie der techn.Chemie,Bd.II/1 (1961), S.866; Verlag Urban-Schwarzenberg, München - Berlin

9) H.Mauser, H.J.Niemann und R.Kretschmer, Z.Naturforsch. 27b, (1972), 1349 - 1353

10) H.J.Niemann und H.Mauser, Z.Physik.Chem. NF, 82 (1972), 295

11) H.Lachmann, H.Mauser, Fr.Schneider und H.Wenck, Z.Naturforsch. 26b (1971), 629

12) H.Wenck und J.Polster, Hel.Chim.Acta Nr.212 (1973), 2036-2044

13) H.J.Niemann, Dissertation, Tübingen 1972

14) E.A.Guggenheim, Phil.Mag. 2, 538 (1926)

15) H.Lachmann, Dissertation, Tübingen 1973

16) E.S. Swinbourne, J.Chem.Soc. 473, 2371 (1960)

17) H.Mauser und J.Polster, Z.Phys.Chem. NF, eingereicht

18) E.Bayer, M.Mutter, R.Uhmann, H.Mauser und J.Polster, Veröffentlichung in Vorbereitung

19) A.W.Williams and G.T.Young, J.Chem.Soc. (C) (1968), 52, 1194-1200

20) P.R.Rony, J.Am.Chem.Soc., 22 (1969), 6090-6096

21) Mackensie and Winter, Trans. Faraday Soc., 44, 159, 171, 243 (1948)

22) Handbook of Biochemistry, H.A.Sober and R.A.Harte, The Chemical Rubber Co., Cranwood Parkway, Cleveland, Ohio, 2nd Edition, S. J-198

23) S.Hünig, Angew.Chem. 76, 400 (1964)

24) D.Cook, Canad.J.Chem. 40 (1962), 2362-2368

25) H.Lachmann, Dissertation, Tübingen 1973

26) J.F.Coetzee and G.R.Padmanabhan, J.Am.Chem.Soc. 87, 5005 (1965)

27) H.K.Hall,Jr., J.Physic.Chem. 60, 63 (1956)

28) Istvan Gyenes, "Titrationen in nichtwässrigen Medien", S.49, 250 ff., 373, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1970

29) D.B.Bruss and G.A.Harlow, Analytic.Chem. 30, 1836 (1958)

30) Forbes and Knight, Canad.J.Chem. 37, 334 (1959)

31) Forbes and Knight, Canad.J.Chem. 36, 180 (1958)

32) R.H.Andreatta und H.Rink, Helv.Chim.Acta, Vol.56 (1973), 1205-1218

33) M.Mutter, H.Hagenmaier und E.Bayer, Angew.Chem. 83, 883 (1971)

34) M.Mutter und E.Bayer, Nature 237, 512 (1972)

35) M.Mutter und e.Bayer, Angew.Chem., im Druck

36) V.V.Kosmynin, Yu.A.Sharanin and L.M.Litvinenko, Zhurnal Organicheskoi Khimii, Vol.8, No.1, p.3-9, January 1972

37) N.Nakamizo, Bull.Chem.Soc.Jap. 42, 1071 (1969)

38) T.C.Bruice and M.F.Mayahi, Bull.Chem.Soc.Jap. 82, 3067 (1960)

39) H.Beyer, "Lehrbuch der organischen Chemie", S.Hirzel Verlag, Leipzig 1966, S.729, 536

40) W.E.Spiess, F.G.Rheingans, "Programmieren in Fortran", De Gruyter, Berlin 1970

41) CDC-Manual (Fa. Control Data)

42) H.Mauser, G.Gauglitz und H.J.Niemann, Z.Physik.Chem. NF, 82 (1972), 309

LEBENSLAUF

Am 14.8.1944 wurde ich in Crossen a.d.Oder geboren.
Meine Eltern sind Dr.med.Werner Polster und Hanna Polster, geb. Joachim. Unsere Familie flüchtete 1948 in den Westen.

Die Grundschule besuchte ich von 1951 bis 1956 in Schömberg Krs. Calw und in Zell a.Harmersbach. Von 1956 bis zum Abitur 1965 absolvierte ich das naturwissenschaftliche mathem.Gymnasium in Neuenbürg Krs. Calw.

Das Studium der Biochemie begann ich im Sommersemester 1965 in Tübingen. Das 3.Semester belegte ich in München. Das Studium wurde anschliessend in Tübingen fortgesetzt.

Im März 1966 legte ich den ersten Teil und im März 1968 den zweiten Teil der Vordiplom-Prüfung in Biochemie ab. Ende Juli 1970 bestand ich den mündlichen Teil der Diplom-Hauptprüfung in Biochemie.

Im Juni 1971 beendete ich unter der Leitung von Herrn Professor Dr.H.Mauser und Herrn Professor Dr.H.Wenck meine Diplomarbeit über das Thema "Mechanistische Untersuchung der Aminolyse und Imidazo - lyse von Thioestern als enzymatische Modellreaktion sowie der Oxidation von aromatischen Mercaptanen".

Meine Dissertation entstand in der Zeit vom September 1971 bis November 1973 unter der Anleitung von Herrn Professor Dr.H.Mauser im Institut für Physikalische Chemie der Universität Tübingen. Der Titel lautet: "Neue Methoden zur kinetischen Analyse von Reaktionen 2.Ordnung".

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in München: Paetzold, Schmidpeter, Schwab, Stuke, Wiberg
in Tübingen: E.Bayer, Braun, Buddecke, Bues, Bünning, Dickmann, Frank, Guglielmi, Häfelinger, Hanack, Heiss, Hillmann, Kessler, Kortüm, Krauss, Krüger, Machleidt, Mauser, Möhres, Mörike, E.Müller, Oelkrug, Opitz, Probst, Rau, Rieker, Rüdorff, Scheffler, Fr.Schneider, Schwartz, Schweizer, Seelig, Seyffert, Stumpp, Suhr, Weitzel, Wenck, Zähner, Zeil.